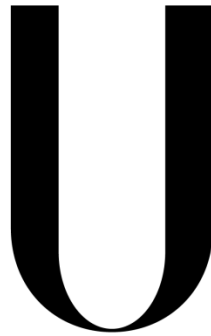


**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

Departamento de Biologia Animal



**LISBOA**

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**A Influência do Stress Hídrico e da Eutrofização  
do Solo na Doença da Murchidão do Pinheiro**

**Filipe de Jesus Colwell**

**Dissertação**

**Mestrado em Biologia da Conservação**

**2013**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Ciências**

Departamento de Biologia Animal



**LISBOA**

---

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA

**A Influência do Stress Hídrico e da Eutrofização  
do Solo na Doença da Murchidão do Pinheiro**

**Filipe de Jesus Colwell**

**Dissertação**

**Mestrado em Biologia da Conservação**

**Orientadores: Professora Doutora Cristina Maria Filipe Máguas  
da Silva Hanson e Professora Doutora Otília da Conceição  
Alves Correia Vale de Gato**

**2013**

## Abstract

Pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) is the causal agent of pine wilt disease. Due to the high mortality and speed with which this disease can spread it is considered one of the biggest threats to pine trees in the world. It causes considerable economic and environmental damage, severely changing forest composition. Pine wood nematode is dependent on an insect vector of the genus *Monochamus* for short range transmission and on the timber industry for long range transmission.

This work seeks to study the development of pine wilt disease in *P. radiata* and *P. pinaster* under water stress at a moderate temperature (20°C), which is considered to be the limit for the development of the disease. It also seeks to study the effects of soil eutrophication in *P. pinaster* in combination with high temperature (25°C). For that, a greenhouse experiment was carried out using both pine species plants directly infected by *Bursaphelenchus xylophilus*. Throughout this study various physiological parameters and the symptomology were observed to determine whether any of the physiological parameters would permit the disease to be detected before the appearance of visible symptoms. This study showed that water stress is an important factor in the development of pine wilt disease, although with a different degree in each pine species. For *P. pinaster*, water stress resulted in a mortality of 37.5%; however, for *P. radiata* water stress had a much stronger effect, resulting in a 75% mortality. Soil eutrophication does not seem to have any effect on the evolution of the disease, given that all treatments expressed a similar development of the disease and similar mortality (between 12,5-25%). However, the relative small number of individuals that developed the disease prevents solid conclusions. Moreover, none of the physiological parameters observed during this study allowed the detection of pine wilt disease before the onset of symptoms occurred.

**Key-words:** *Bursaphelenchus xylophilus*; Pine wilt disease; Water Stress; Soil eutrophication; Symptomology

## Resumo

O nemátode da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) provoca a doença da murchidão do pinheiro. Devido à grande mortalidade e à rapidez com que esta doença se pode espalhar é considerada uma das maiores ameaças para os pinheiros no mundo. Provoca graves danos económicos e ecológicos, alterando fortemente a composição florestal. O nemátode do pinheiro está dependente de um insecto vector do género *Monochamus*, para a sua transmissão a curta distância, sendo o comércio da madeira a principal causa da sua transmissão a longa distância.

Neste trabalho procurou-se estudar o desenvolvimento da doença da murchidão do pinheiro, em *P. radiata* e *P. pinaster*, sobre stress hídrico, a uma temperatura moderada (20°C), considerado como o limite para o desenvolvimento da doença da murchidão do pinheiro. Também se procurou estudar o efeito da eutrofização do solo, em *P. pinaster*, a uma temperatura elevada (25°C). Para esse fim, foi realizada uma experiência em estufa utilizando indivíduos de ambas as espécies directamente infectados com *Bursaphelenchus xylophilus*. Neste estudo observou-se vários parâmetros fisiológicos e a sintomatologia, para se determinar se algum destes parâmetros fisiológicos permite detectar a doença antes do aparecimento de sintomas visíveis. Pôde-se observar que o stress hídrico é um factor muito importante no desenvolvimento da doença, mas com um grau diferente para cada espécie. Em *P. pinaster*, o stress hídrico resultou numa mortalidade de 37,5%, enquanto em *P. radiata* o stress hídrico teve um efeito muito mais acentuado, resultando numa mortalidade de 75%. A eutrofização do solo não parece ter afectado a evolução da doença, tendo todos os tratamentos apresentado uma evolução da doença e mortalidade semelhantes (entre 12,5-25%), mas o pequeno número de indivíduos que desenvolveram a doença impossibilita conclusões definitivas. Nenhum parâmetro fisiológico utilizado neste trabalho permitiu detectar a doença antes de esta apresentar sintomas visíveis.

**Palavras-chave:** *Bursaphelenchus xylophilus*; Doença da murchidão do pinheiro; Stress Hídrico; Eutrofização do solo; Sintomatologia

## Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof<sup>a</sup> Doutora Otília Correia e Prof<sup>a</sup> Doutora Cristina Máguas pela oportunidade de realizar este trabalho, como também pelo apoio e conselhos ao longo do trabalho.

Ao Doutor Luís Fonseca do Laboratório de Nematologia, Departamento de Ciências da Vida, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, com todo o trabalho relacionado com a criação, inoculação e ainda a quantificação final de *B. xylophilus*.

À Patrícia Fernandes pela ajuda na preparação e planeamento do trabalho.

À Katharina Kneissl pela ajuda durante a fase inicial do trabalho de estufa, sem ela não teria sido possível realizar o trabalho com a intensidade necessária.

À Catarina Costa cuja companhia e ajuda foram essenciais tanto durante o trabalho na estufa como na organização dos dados.

Às minhas amigas Inês e Sofia pela paciência, apoio e companhia.

E por fim, um grande obrigado à minha família, em especial os meus pais, por todo o apoio que me deram durante o trabalho.

# Índice

Abstract .....	i
Resumo .....	ii
Agradecimentos .....	iii
Índice .....	iv
1 Introdução .....	1
2 Materiais e Métodos .....	6
2.1 Desenho Experimental .....	6
2.2 Inoculação dos indivíduos com o nemátode .....	7
2.3 Monitorização das condições ambientais .....	7
2.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos, vitalidade e crescimento .....	10
2.5 Quantificação dos Nemátodes .....	13
2.6 Tratamento Estatístico .....	13
3 Resultados e Discussão .....	14
3.1 Efeito do Stress Hídrico no potencial de infecção, a 20°C .....	14
3.1.1 Relações Hídricas e Trocas Gasosas .....	14
3.1.2 Índices fisiológicos .....	18
3.1.3 Sintomatologia e Quantificação de Nemátodes .....	21
3.1.4 Crescimento Relativo .....	24
3.2 Efeito da fertilização do solo no potencial de infecção, a 25°C .....	27
3.2.1 Relações Hídricas .....	27
3.2.2 Índices fisiológicos .....	29
3.2.3 Sintomatologia e Quantificação dos Nemátodes .....	31
3.2.4 Crescimento Relativo .....	33
4 Considerações Finais .....	35
5 Referências Bibliográficas .....	37
Anexos .....	41
ANEXO I – Cronogramas .....	41
ANEXO II – Inoculação de <i>B. xylophilus</i> .....	43

# 1 Introdução

O nemátode da madeira do pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*) provoca a doença da murchidão do pinheiro, que é uma das maiores ameaças para as florestas de pinheiros no mundo. Devido às elevadas taxas de mortalidade e rapidez com que esta doença se propaga, os pinhais infectados perdem quantidades significativas de árvores, que representam não só uma grande perda económica (Webster & Mota, 2008) como também terá um efeito destrutivo para as espécies que estejam dependentes de florestas saudáveis (Cabral et al., 2006).

*Bursaphelenchus xylophilus* é um nemátode vermiforme com menos de 1mm de comprimento (Hasegawa, 2008) sendo considerado uma das mais importantes pestes ou patógenos das florestas de *Pinus spp.* em todo o mundo (Vicent et al., 2012). É fitófago e micófago, sendo capaz de se alimentar tanto das células da árvore hospedeira como de fungos que se encontrem nos tecidos das árvores (Aikawa, 2008; Sriwata et al., 2008; Wang et al., 2008). A propagação e transmissão do nemátode da madeira do pinheiro está totalmente dependente de um insecto vector, um besouro do género *Monochamus*. Todas as espécies deste género têm potencial para transmitir o nemátode, sendo de especial importância o *M. carolinensis*, o *M. alternatus* e *M. galloprovincialis* que são os principais vectores na América do Norte, Extremo Oriente e Península Ibérica, respectivamente. (Aikawa, 2008; Linit & Akinulut, 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008). O insecto vector beneficia desta relação com o nemátode, uma vez que este está dependente de pinheiros doentes e recentemente mortos para depositar os seus ovos. Em florestas infectadas com o nemátode da madeira do pinheiro há uma grande abundância de árvores doentes, o que permite assim o aumento populacional de *Monochamus spp.* que por sua vez aumenta a propagação do nemátode (Aikawa, 2008).

A doença da murchidão do pinheiro foi reportada pela primeira vez em 1905 no Sul do Japão, e apesar de grandes esforços para combater a doença, esta espalhou-se pela maioria do território japonês (Mamiya, 1988; Futai, 2008). Só em 1971 se descobriu que a causa da doença era o nemátode da madeira do pinheiro (Zhao et al., 2008). Em 1982/1983 o nemátode do pinheiro foi detectado na China, e em Taiwan (Zhao, 2008), e em 1988 na Coreia do Sul (Shin, 2008). A doença da murchidão do pinheiro foi detectada nos Estados Unidos da América em 1979 e em 1983 no Canadá tendo-se descoberto que o nemátode se encontrava difundido pelo continente Norte Americano e que seria nativo deste (Sutherland, 2008). Este patógeno não provoca danos significativos na América do Norte, aparentemente as espécies de pinheiro nativas apresentam alguma capacidade de resistência e as condições ambientais são geralmente frias demais para ocorrer o desenvolvimento da doença nas espécies nativas, desenvolvendo-se só em espécies não nativas (Rutherford & Webster, 1987; Sutherland, 2008).

A introdução do nemátode da madeira do pinheiro em áreas onde este não é nativo (fora da América do Norte) está principalmente associado ao comércio de madeira e ao fluxo global dos produtos florestais (Futai, 2008; Gu et al., 2008). Sendo este

depois propagado pelas espécies nativas de *Monochamus spp.* (Futai, 2008; Aikawa, 2008; Linit & Aknulut, 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008).

Apesar das medidas tomadas pela “*European and Mediterranean Plant Protection Organization*” (EPPO) e pela União Europeia, para prevenir a introdução accidental de *B. xylophilus* com a importação de madeiras ou de produtos seus derivados de zonas infectadas, *B. xylophilus* foi detectado pela primeira vez na Europa, em Portugal, em 1999 na península de Setúbal, em pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) (Mota et al., 1999; Mota & Vieira, 2008). Em 2000, como resposta a esta praga, a Autoridade Florestal Nacional (DGRF) iniciou o Programa Nacional de Luta Contra o Nemátodo da Madeira do Pinheiro (PROLUNP), com o objectivo de impedir a propagação do nemátode pelo resto do território português (Mota & Vieira, 2008; Rodrigues, 2008). Como o nemátode se encontrava confinado numa pequena região, definiu-se uma zona demarcada que se subdividiu em zona afectada e zona tampão, sendo o resto do território português declarado zona livre, havendo nesta zona áreas de risco (locais de processamento ou armazenamento de madeira). À medida que a zona afectada aumentava, foram redefinidas as áreas das zonas. Em 2007 realizou-se o abate de pinheiros numa faixa de 3km de largura em redor da área demarcada, para diminuir a probabilidade da doença se propagar (Rodrigues, 2008). Apesar das várias medidas aplicadas, em 2008 o nemátode foi detectado noutras regiões de Portugal e em 2009 na ilha da Madeira. Actualmente considera-se difundido por todo o território português como área afectada, sendo considerado toda a fronteira com Espanha, até 20Km para o interior, uma zona tampão. (Vivente et al., 2012). Em 2011 foi confirmada a presença do nemátode na Galiza, Espanha (Vivente et al., 2012).

A doença da marchidão do pinheiro tem provocado graves perdas económicas nos países afectados, por exemplo no Japão a perda média anual ascende o 1 milhão de m<sup>3</sup> de madeira desde 1970, e desde a sua introdução na China mais de 50 milhões de árvores (cerca de 12 000 hectares de floresta) foram destruídos e 2 milhões de árvores na Coreia do Sul (Mamiya, 1988; Shin, 2008; Zhao et al., 2008). A doença da marchidão do pinheiro não só causa grandes danos económicos como também altera profundamente os ecossistemas. As florestas do sul do Japão dominadas por *Pinus densifora* (Pinheiro Vermelho do Japão), foram substituídas por florestas mistas de *Pinus densifora* e *Quercus serrata*, contudo nos últimos anos é difícil encontrar pinheiros saudáveis nestas florestas (Futai, 2008).

Portugal é um país com vastas áreas florestais, contendo 3 541 000 ha de florestas (38% do território nacional), dos quais 892 000 ha são de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*), 130 000 ha de pinheiro-manso (*Pinus pinea*) e 25 000 ha de outras resinosas, representando 25%, 3,7% e 0,7% da área florestal nacional, respectivamente. A silvicultura é um sector importante na economia portuguesa, representando 12% da produção industrial nacional, 3,2% do Produto Interno Bruto, 10% de trocas comerciais internacionais sendo igualmente responsável por 5% da força trabalhadora nacional (Webster & Mota, 2008). Como tal, é essencial Portugal investir na gestão destas florestas de maneira a minimizar os danos causados por esta doença (Ikeda, 2008; Amaral, 2009).



Como resposta ao perigo desta doença muitos países, considerados ainda livres do nemátode, têm vindo a realizar estudos para avaliar a presença do nemátode nas suas florestas, a capacidade deste poder estabelecer-se e os potenciais danos que poderá provocar. (Akbulut et al., 2008; Hodda et al., 2008; Karnkowski, 2008; Lawson & Sathyapala, 2008; Schönfeld et al., 2008).

Em condições naturais o nemátode é transportado pelo *Monochamus spp.*, estando o ciclo de vida do *B. xylophilus* sincronizado com o do insecto vector. Enquanto o insecto se alimenta da casca e folhas de ramos de pinheiros saudáveis, o nemátode sai do sistema traqueal do insecto vector e entra pelas feridas criadas durante a alimentação deste (Aikawa, 2008). O nemátode entra nos canais resiníferos e começa a causar danos nas células epiteliais dos canais resiníferos, seguido pela destruição progressiva das células do parênquima em redor destes canais. A população de nemátodes começa rapidamente a crescer, aumentando o ritmo de destruição das células, com o aumento populacional os nemátodes começam a espalhar-se para outras secções da árvore, alimentando-se do parênquima em redor dos canais resiníferos na zona do xilema (Fukuda, 1997; Ichihara et al., 2000; Mamiya, 2008). A morte progressiva das células do parênquima do xilema leva à cavitação dos vasos xilémicos, diminuindo o transporte de água nestes e alterando desta forma o balanço hídrico ao nível das folhas. O embolismo dos vasos xilémicos leva a uma diminuição do potencial hídrico ao nível das folhas, esta diminuição provoca o encerramento estomático, portanto uma diminuição das trocas gasosas (Fukuda, 1997). A alteração nestes processos fisiológicos é acompanhada por um amarelecimento progressivo das folhas, provocado em parte pelo aumento da produção de etileno, em resposta à infecção, que provoca a degradação da clorofila, e, nas fases mais avançadas da doença, pela dissecação progressiva das folhas (Fukuda, 1997). Com o aumento da destruição do parênquima, aumenta o número de cavitações, até que a circulação de água é interrompida levando à morte da árvore (Fukuda, 1997; Utsuzawa et al., 2005; Fukuda et al., 2007; Mamiya, 2008). Como o amarelecimento das folhas é progressivo, foi possível criar uma escala simples de sintomatologia, baseada na percentagem de folhas secas, para detectar no campo árvores doentes e identificar o estado de desenvolvimento da doença (Proença et al. 2010), mas apesar da existência desta escala, a única maneira fidedigna de se confirmar a presença do nemátode da madeira do pinheiro é através da recolha de amostras de madeira, seguido ou pela extracção e identificação morfológica do nemátode ou a realização de um teste genético para determinar a presença do nemátode (Cardoso et al., 2012).

A temperatura é um dos factores que afecta fortemente o desenvolvimento do nemátode e do insecto vector (Futai, 2008; Naves et al., 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008; Hasegawa, 2008; Takemoto, 2008). A emergência de *Monochamus galloprovincialis* ocorre entre Maio e Setembro, com um pico em Julho, começando mais cedo quando as temperaturas são mais altas. O período típico de actividade de um insecto é cerca de 2 a 4 meses (Naves et al., 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008), encontrando-se indivíduos activos até Outubro, Novembro quando as temperaturas são mais altas. Durante este período o insecto alimenta-se intensivamente nas primeiras semanas, sendo este o período onde ocorre a maior transmissão do nemátode para pinheiros saudáveis (Aikawa, 2008), sendo no final deste período que o insecto vector procura árvores debilitadas para pôr os seus ovos

(Aikawa, 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008). O seu ciclo de vida é também fortemente afectado pela temperatura, em Portugal este insecto apresenta um ciclo de vida anual, mas em climas mais frios o ciclo de vida pode ser de dois anos (Naves et al., 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008). O nemátode desenvolve-se mais rapidamente com temperaturas elevadas, sendo nos períodos mais quentes que as árvores hospedeiras infectadas apresentam o desenvolvimento da doença da marchidão do pinheiro (Futai, 2008; Hasegawa, 2008; Takemoto, 2008). O nemátode consegue, em condições favoráveis, provocar a morte de um hospedeiro susceptível em 3 a 5 semanas (Utsuzawa et al., 2005; Fukuda et al., 2007; Mendes, 2012). Verificou-se que só a temperaturas médias superiores a 20°C as espécies susceptíveis desenvolvem a doença, em condições naturais (Rutherford & Webster, 1987). A disponibilidade hídrica, associada a temperaturas elevadas pode afectar a capacidade do pinheiro resistir à infecção, uma vez que o stress hídrico pode induzir cavitação dos vasos xilémico, por si só (Lebourgeois et al., 1998; Meinzer et al., 2001; Delzon et al., 2010). O efeito combinado da cavitação por danos causados pelo nemátode e pelo stress hídrico leva a um desenvolvimento da doença mais acelerado.

Com base na influência destes factores ambientais verifica-se que a mortalidade aumenta com o aumento da temperatura e o do stress hídrico (Mendes, 2012). Sendo por isso de esperar que, com o aumento progressivo da temperatura previsto durante o próximo século (Chapin et al., 2000; Sala et al., 2000; Choat et al., 2012; Engelbrecht, 2012), aumente o período de actividade do insecto vector, diminua o ciclo de vida tanto do nemátode como do insecto vector e que o aumento do stress hídrico, associado ao aumento da temperatura, leve a uma diminuição da capacidade de hospedeiros potenciais resistirem ao nemátode. Prevendo-se por isso um aumento da propagação da doença não só em zonas já afectadas, como também uma propagação mais rápida para zonas consideradas ainda livres do nemátode bem como para zonas onde anteriormente a doença não se manifestaria devido às temperaturas baixas. As alterações climáticas não são os únicos factores a ter em consideração relativamente ao avanço e impacto da doença da marchidão do pinheiro, é preciso considerar também as alterações previstas na utilização do uso dos solos, tendo em especial atenção o abandono progressivo do meio rural, e o aumento da eutrofização do solo devido à deposição de azoto atmosférico (Chapin et al., 2000; Sala et al., 2000). Com o abandono do meio rural, a gestão fitossanitária das florestas é também abandonada, sendo esta essencial na mitigação da propagação e dos danos causados pela doença (Ikeda, 2008; Amaral, 2009). A eutrofização do solo é um factor pouco estudado relativamente ao nemátode da madeira do pinheiro, Futai (2008) observou uma propagação da doença mais rápida com a fertilização do solo com nitrato, eventualmente devido a uma redução da micorrização, pinheiros fertilizados ficam assim mais vulneráveis ao stress hídrico. Entretanto outros autores demonstraram que os insectos apresentam uma preferência alimentar por pinheiros fertilizados (Zas et al., 2006; Zas et al., 2008) sendo ainda necessário averiguar se as espécies do género *Monochamus* apresentam o mesmo comportamento, mas explicaria porque pinhais fertilizados apresentam ritmos mais rápidos de propagação da doença.

Este trabalho insere-se no âmbito do projecto “*Desenvolvimento de um sistema de gestão adaptativa para prever e mitigar os danos causados pelo nemátode do pinheiro Bursaphelenchus xylophilus (Nematoda: Aphelenchoididae) em Portugal*” (PTDC/AGR-

CFL/098869/2008), cujo objectivo é estudar os limites de tolerância aos factores ambientais que determinam o estabelecimento da doença, na espécie de pinheiro mais importante em Portugal

Os primeiros estudos realizados no âmbito deste projecto por Mendes (2012) que estudou o efeito do stress hídrico no desenvolvimento do nemátode em *Pinus pinaster*, *Pinus radiata* e *Pinus pinea*, sob temperaturas de 25°C e 30°C, demonstraram que a temperatura associada ao stress hídrico é um factor fundamental na propagação da doença. Tendo-se concluído que *P. pinaster* e *P. radiata* são susceptíveis ao nemátode quando em temperaturas iguais ou superiores a 25°C e que por outro lado o potencial infeccioso aumenta em condições de stress hídrico. *P. pinea* por outro lado não mostrou ser susceptível ao nemátode mesmo em condições de stress hídrico e de temperatura elevada.

De acordo com estes resultados obtidos por Mendes (2012) e considerando igualmente as alterações globais previstas, o aumento das temperaturas, dos extremos de seca e ainda o aumento da eutrofização, este trabalho teve como principais objectivo avaliar:

- I) O efeito do stress hídrico a 20°C, temperatura proposta por alguns autores como o limiar a partir do qual não se observa o potencial infeccioso do nemátode não havendo o desenvolvimento da doença da marchitidão do pinheiro (Rutherford & Webster, 1987). Esta avaliação foi efectuada apenas em *P. pinaster* e *P. radiata* uma vez que *P. pinea* não mostrou susceptibilidade ao nemátode para temperaturas superiores e inicialmente testadas (Mendes, 2012).
- II) O efeito da fertilização do solo, a 25°C, em *P. pinaster*.
- III) A utilização de parâmetros fisiológicos que permitam detectar precocemente a infecção pelo nemátode, antes da manifestação dos sintomas de vitalidade

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Desenho Experimental

As experiências foram realizadas nas estufas do Departamento de Biologia Vegetal no Campus da FCUL, tendo sido utilizados 2 compartimentos independentes que foram programados para temperaturas diferentes – 20 °C (compartimento 1) e 25 °C (compartimento 2) e humidade relativa de cerca de 50%.

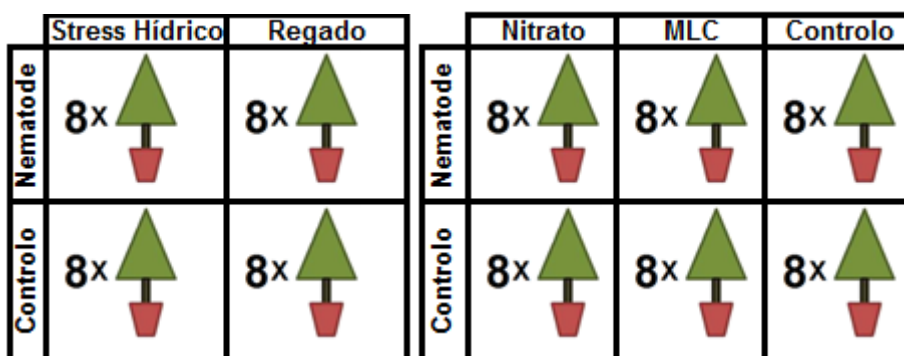
O estudo do efeito do stress hídrico a 20°C foi realizado em indivíduos envasados (vasos de 10 a 13 litros) com cerca de 4 a 5 anos, provenientes do Instituto Superior de Agronomia (*Pinus pinaster*), e dos viveiros florestais da Herdade da Espirra em Pegões (*Pinus radiata*). Os *pinheiros* foram colocados no compartimento 1 da estufa, a 20°C, no mês de Novembro, tendo sido aclimatados a esta temperatura durante cerca de 5 meses. Após aclimação, 32 indivíduos de cada espécie foram submetidos a um tratamento factorial de 2x2, com 2 regimes de rega (16 indivíduos em stress hídrico e 16 indivíduos com disponibilidade hídrica regular) cada um destes tratamentos foi submetido a 2 tratamentos de inoculação com nemátode da madeira do pinheiro (16 indivíduos infectados com nemátode e 16 não infectados - controlo), num total de 4 tratamentos com 8 indivíduos por tratamento (Figura 1).<sup>1</sup>

A partir de 20 de Março 2012 (15 dias antes da inoculação com o nemátode) foi aplicado o regime de rega nos indivíduos, realizado de acordo com o estudo anterior (Mendes, 2012), de forma a manter o conteúdo hídrico do solo semelhante aos valores obtidos na primeira experiência. Em *P. radiata* o conteúdo hídrico do solo foi mantido entre 0,15 a 0,18 m<sup>3</sup>m<sup>-3</sup> e 0,040 a 0,070 m<sup>3</sup>m<sup>-3</sup> para o conjunto de indivíduos com disponibilidade hídrica regular e com stress hídrico respectivamente. Em *P. pinaster* os valores foram ligeiramente superiores variando entre 0,18 a 0,25 m<sup>3</sup>m<sup>-3</sup> e 0,08 a 0,12 m<sup>3</sup>m<sup>-3</sup> para os indivíduos com disponibilidade hídrica regular e com stress hídrico respectivamente.

O efeito da fertilização do solo foi estudado apenas em *Pinus pinaster* a 25°C. Os pinheiros envasados com 4 a 5 anos, e provenientes do Instituto Superior de Agronomia foram colocados no compartimento (2) a 25°C, no mês de Janeiro, tendo sido aclimatados a esta temperatura durante cerca de 3 meses. Após aclimação, 48 indivíduos foram submetidos a um tratamento factorial de 3x2, com 3 regimes de adubação (16 indivíduos sem adubação, 16 indivíduos com adubo liquido - Monty's Liquid Carbon e 16 indivíduos com Nitrato de Amónia) e 2 tratamentos de inoculação com o nemátode da madeira do pinheiro (24 indivíduos infectados e 24 não infectados), num total de 6 tratamentos com 8 indivíduos por tratamento (Figura 1).<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Em Março devido ao aparecimento de um fungo não identificado nos ramos dos pinheiros procedeu-se à aplicação de fungicidas (Baycor S –bitertanol a 0,05% e Horizon - triazol a 0,04%) precedido de lavagem com água na zona afectada de forma a remover o máximo de fungo. Neste mesmo período, aplicou-se um insecticida (Karate Zeon da Syngenta – 1,2-benzisotiazol-3(2H) a 0,01%) para combater uma praga de afídios e aranhas.



**Figura 1** – Desenho Experimental do Stress Hídrico a 20°C (esquerda) e da Fertilização do Solo a 25 °C (direita)

A fertilização com nitrato de amónia foi realizada no dia 6 de Janeiro de 2012, regando-se cada indivíduo com 0,5 litros de uma solução de 11,6g/l de Nitrato de Amónia (o equivalente a 40Kg N/hectare). A fertilização com Monty's Liquid Carbon (MLC), um produto agrícola que, de acordo com o fornecedor, contém ácidos húmicos, melhora o pH do solo e aumenta a absorção dos nutrientes do solo, foi realizada de 6 de Janeiro a 20 de Março aplicando-se regularmente 6 doses de 0,64 litros a 0,167% de acordo com as instruções do fornecedor Monty's Plant and Soil Products. Os indivíduos foram regados com regularidade de forma a manter o conteúdo hídrico do solo entre 0,18 e 0,25 m<sup>3</sup>m<sup>-3</sup> para todos os tratamentos.

## 2.2 Inoculação dos indivíduos com o nemátode

A inoculação dos pinheiros com o nemátode *Bursaphelenchus xylophilus* foi efectuada no dia 4 de Abril de 2012, com cerca de 6000 nemátodes por indivíduo, numa solução de 500μl de água destilada e esterilizada. Os indivíduos controlo, sem infecção com nemátode foram inoculados com a mesma quantidade de solução (500μl de água destilada e esterilizada). A cultura de nemátodes utilizada foi produzida no Laboratório de Nematologia, Departamento de Ciências da Vida, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra a partir de *Pinus pinaster* naturalmente infectado e proveniente de Alcácer do Sal.

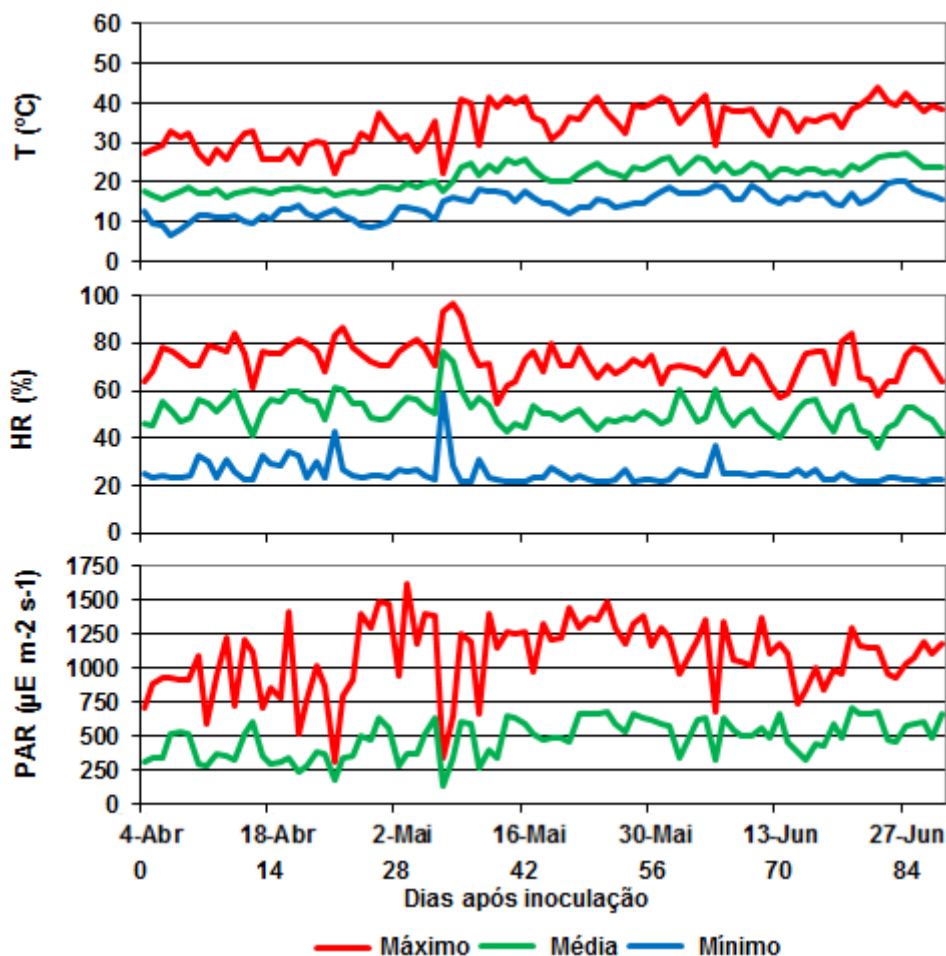
A inoculação foi realizada pouco abaixo da primeira ramificação, tendo-se raspado ligeiramente a casca de maneira a expor o floema, seguido por um corte ao longo da superfície da casca, um pouco acima do local raspado. Colocou-se algodão humedecido com água esterilizada a tapar a maior parte da ferida, deixando uma abertura para a ferida exposta onde se inoculou a solução com o nemátode. No final cobriu-se por completo a ferida com algodão humedecido e envolveu-se com Parafilm (Figura 16, Anexo II).

## 2.3 Monitorização das condições ambientais

As condições ambientais no interior das estufas, Temperatura (T) e Humidade Relativa do ar (HR), Radiação Fotossinteticamente Activa (PAR), foram monitorizadas através de 2 sensores com data loggers integrados (HOBO, Onset, Bourne, EUA), por

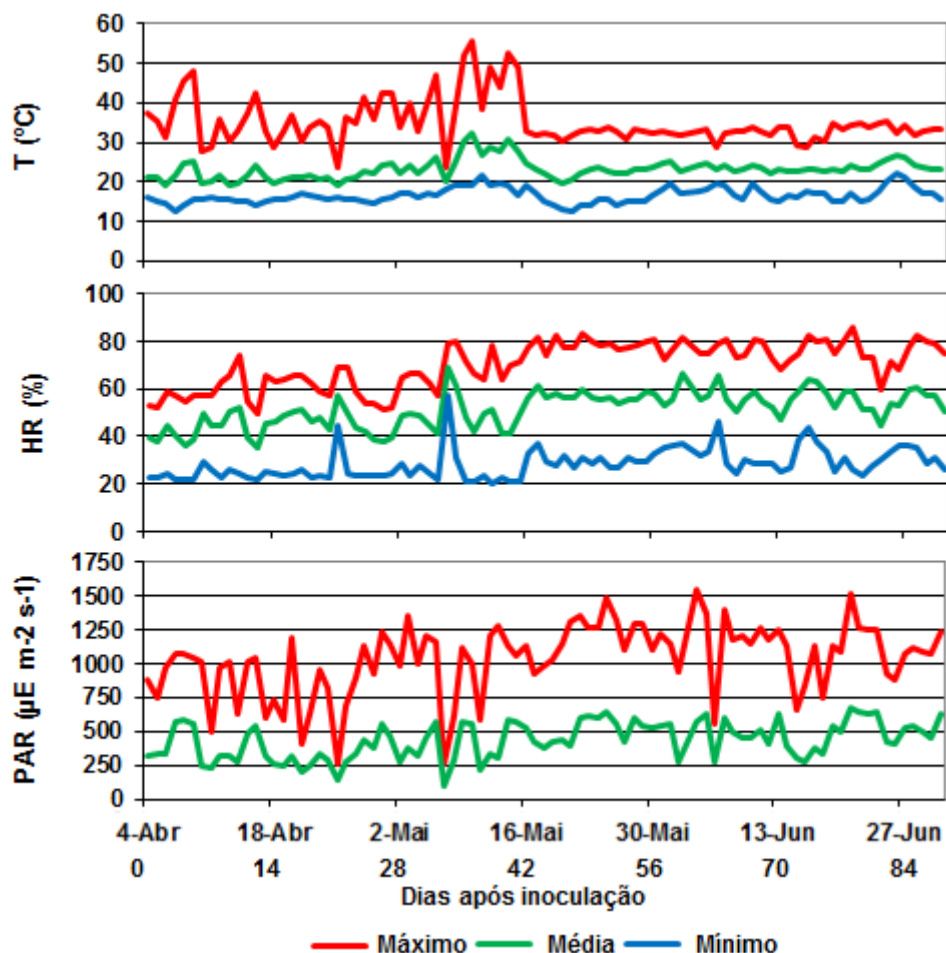
compartimento, ao longo de todo o período de estudo com uma periodicidade de 60 minutos. Na Figura 2 e 3 representa-se a variação destes factores ambientais durante o período de estudo após a inoculação do nemátode (4 de Abril a 1 Julho 2012),

No compartimento 1, onde decorreu a experiência do stress hídrico, durante o período de estudo pós inoculação a temperatura apresentou um valor médio de 21,4°C, variando os valores médios da máxima de 34,4°C a um mínimo de 14,3°C. A humidade relativa manteve um valor médio de 51,2%, variando de 72,9% a 25,5%. A radiação fotossinteticamente activa (PAR) apresentou um valor médio de 480 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  apresentando valores médios máximos que atingiram 1080 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 2)



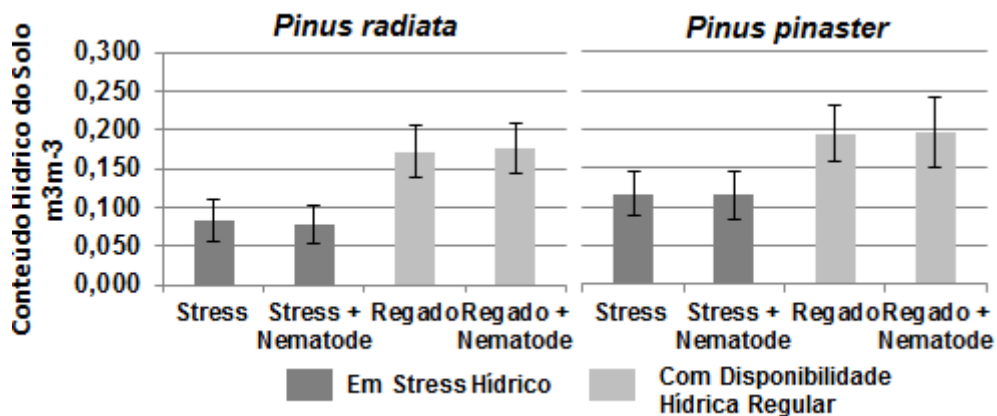
**Figura 2** – Variação da Temperatura (T), Humidade Relativa do ar (HR), e radiação fotossinteticamente activa (PAR) durante o período após a inoculação no compartimento 1.

No compartimento 2, onde decorreu a experiência de fertilização do solo, durante o período de estudo a temperatura apresentou um valor médio de 23,2°C, vendo os valores médios da máxima de 35,1°C e da mínima de 16,5°C. A humidade relativa manteve um valor médio de 51,3%, variando de 70,1% a 28,3%. A radiação fotossinteticamente activa (PAR) apresentou um valor médio de 440 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  apresentando valores médios máximo que atingiram 1030 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . (Figura 3)

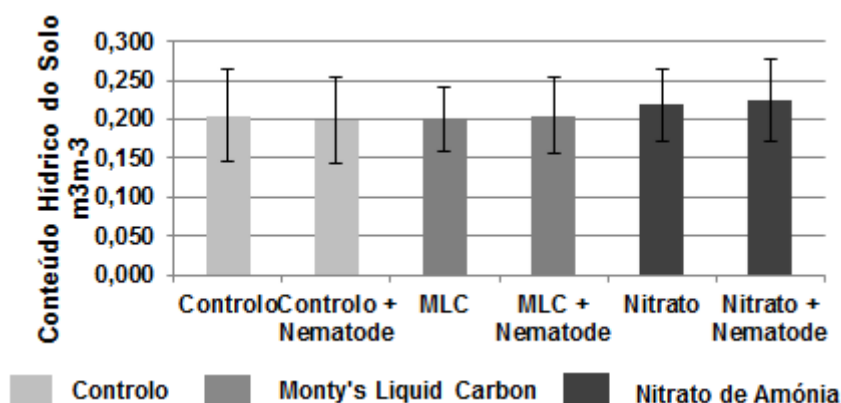


**Figura 3** – Variação da Temperatura (T), Humidade Relativa do ar (HR), e radiação fotossinteticamente activa (PAR) durante o período após a inoculação no compartimento 2.

O conteúdo hídrico do solo foi medido regularmente ao longo de todo o estudo com uma sonda de humidade do solo (ML2x – ThetaProbe, Delta-T Devices, Cambridge, Reino Unido), que nos permitiu ajustar a quantidade de água a utilizar na rega. Os indivíduos foram regados duas vezes por semana, dois dias antes das medições dos parâmetros fisiológicos. O esquema de rega adoptado permitiu manter os valores do conteúdo hídrico do solo dentro da escala previamente estabelecida como se pode observar nas Figuras 4 e 5. De um modo geral podemos observar que os indivíduos, no período pós inoculação, com stress hídrico apresentaram um valor médio de conteúdo hídrico do solo inferior ( $0,080 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$  e  $0,115 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$ , em *P. radiata* e *P. pinaster* respectivamente) ao dos indivíduos com disponibilidade hídrica regular ( $0,174 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$  e  $0,194 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$ , em *P. radiata* e *P. pinaster* respectivamente), enquanto os indivíduos fertilizados apresentaram sempre valores elevados para todos os tratamentos ( $0,201 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$ ,  $0,203 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$  e  $0,222 \text{ m}^3\text{m}^{-3}$ , no Controlo, MLC e Nitrato, respectivamente).



**Figura 4** – Variação do conteúdo Hídrico do solo dos diferentes tratamentos em *Pinus pinaster* e *Pinus radiata* ao longo do período da experiência do stress hídrico a 20 °C (compartimento 1). Valores médios e desvio padrão dos valores medidos nos dias em que se realizou a medição dos parâmetros fisiológicos (n=120)



**Figura 5** – Variação do conteúdo Hídrico do solo dos diferentes tratamentos em *Pinus pinaster* ao longo do período da experiência da fertilização dos solos a 25 °C (compartimento 2). Valores médios e desvio padrão dos valores medidos nos dias em que se realizou a medição dos parâmetros fisiológicos (n=120)

## 2.4 Avaliação dos parâmetros fisiológicos, vitalidade e crescimento

Avaliou-se o efeito da infecção pelo nemátode nos diferentes tratamentos através da análise das principais características fisiológicas relacionadas com as relações hídricas e a produtividade, a partir do dia 12 de Abril (8 dias após a inoculação) e 13 de Abril (9 dias após inoculação) respectivamente no compartimento 1 (experiência do stress hídrico) e compartimento 2 (experiência da fertilização do solo). Foram realizadas medições de trocas gasosas (Taxa fotossintética, taxa de transpiração e condutância estomática), de reflectância das folhas, de fluorescência da clorofila a e do potencial hídrico das folhas. Estas medições foram realizadas inicialmente duas



vezes por semana e mais tarde uma vez por semana até 1 de Julho (87 e 88 dias após a inoculação) (Ver Cronogramas 1 e 2, Experiência do Stress Hídrico e Experiência da Fertilização do solo respectivamente, Anexo I).

As medições foram realizadas nos oito indivíduos de cada tratamento para todos os parâmetros, com excepção do potencial hídrico e trocas gasosas, onde se utilizou apenas cinco, sempre que possível as medições foram realizadas no mesmo ramo, previamente marcado, com a excepção do potencial hídrico.

- **O potencial hídrico** foi medido de madrugada, entre as 4:00-6:00h ( $\Psi_b$  – potencial hídrico de base) e ao meio dia solar entre as 13:00-14:00h ( $\Psi_{\min}$  – potencial hídrico mínimo), utilizando uma câmara de pressão tipo Schölander (Manofrigido, Lisboa, Portugal).
- **As medições das trocas gasosas** (A – taxa fotossintética, E – taxa de transpiração e G – condutância estomática), foram realizadas numa folha por indivíduo, entre as 9:00-12:00h. Foi utilizado um sistema de trocas gasosas portátil – GFS-3000 (WALZ, Effeltrich, Alemanha) a folha foi colocada na cuvette de forma a que as agulhas ficassem distribuídas paralelamente e submetidas a uma radiação constante de 1000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (photosynthetic photon flux density). Os valores obtidos foram depois corrigidos pela área real das folhas. A área foliar foi medida através de um medidor de área foliar (LI - 3000, LI-COR, Lincoln, EUA).<sup>2</sup>
- **A eficiência fotoquímica máxima** ( $F_v/F_m$ ) medida a partir da fluorescência da clorofila a, foi realizada num grupo de 5 a 10 folhas, de cada ramo marcado, adaptadas ao escuro (realizada de madrugada entre as 3:30-4:00h) utilizando o MINI-PAM (WALZ, Effeltrich, Alemanha)
- **Os índices de reflectância** foram obtidos a partir do espectro de reflectância das folhas medido com um espectroradiómetro (UniSpec-Sc, PP-Systems, Amesbury, EUA), em 3 folhas de cada ramo marcado. Realizaram-se medições de reflectância inicialmente entre as 14:00-16:00 e posteriormente entre as 7:00-9:00<sup>3</sup>.

Os índices de reflectância calculados foram: (i) *Scaled Photochemical Reflectance Index* (sPRI), que se encontra relacionado com a eficiência do uso da radiação fotossinteticamente activa a fotossíntese e a eficiência fotoquímica efectiva (Gamon et al., 1997; Peñuelas et al., 1998; Letts et al., 2008) e (ii) *Normalized Difference Vegetation Index 705* (ND705), que está directamente relacionado com a concentração de clorofila nas folhas (Sims & Gamon, 2002; Letts et al., 2008), segundo as fórmulas:

$$\text{PRI} = \frac{R_{531} - R_{570}}{R_{531} + R_{570}}$$

$$\text{sPRI} = (\text{PRI} + 1)/2$$

$$\text{ND705} = \frac{R_{750} - R_{705}}{R_{750} + R_{705}}$$

<sup>2</sup> Devido a uma avaria no GFS 3000 só foi possível fazer medições até ao dia 26 de Maio (52 dias após inoculação)

<sup>3</sup> Foi efectuada uma correcção a estes valores para corrigir o efeito das horas a que foram realizadas as medições, obtendo-se um valor relativo à média do controlo

- A vitalidade foi avaliada regularmente de 12 de Abril até 20 de Julho e no dia do abate dos pinheiros, utilizando a **escala de sintomatologia** de Proença et al. 2010, que se baseia no grau e percentagem de descoloração das folhas que correspondem a diferentes estádios de vitalidade dos indivíduos (Figura 6) <sup>4</sup>.



- Estádio 0** – Árvore Saudável  
**Estádio I** – <10% folhas castanhas  
**Estádio II** – 10-50% folhas castanhas  
**Estádio III** – 50-80% folhas castanhas  
**Estádio IV** – >80% folhas castanhas  
**Estádio V** – Árvore morta sem folhas

**Figura 6** – Representação visual de cada estágio de vitalidade segundo a escala de sintomatologia (Proença et al. 2010)

- O **crescimento relativo** dos indivíduos de *P. radiata* e *P. pinaster* foi efectuado através da medição da altura e do diâmetro da base de cada indivíduo. No caso de *P. pinaster* mediu-se também o comprimento de 3 ramos marcados e o diâmetro da base dos ramos (Cronogramas 1 e 2, Anexo 1). Calculou-se a taxa de crescimento relativo (Relative Growth Rate, RGR) (Coombs et al., 1985) segundo a fórmula:

$$RGR = \frac{\ln(C1) - \ln(C0)}{T1 - T0}$$

Onde “C1” é o valor do parâmetro medido no final do trabalho tempo 1 (T1) e “C0” é o valor do parâmetro medido no início do trabalho no tempo zero (T0).

<sup>4</sup> Devido às condições da estufa, as folhas não caem das árvores quando secam, por isso considerou-se que as árvores no estágio IV estavam mortas

## **2.5 Quantificação dos Nemátodes**

No final da experiência, entre 26 de Julho e 2 de Setembro, procedeu-se ao corte de todos os indivíduos, separando os ramos, tronco, caule subterrâneo, raízes e solo. Este material foi pesado e guardado (em estado fresco) a 4°C, para posterior avaliação da quantidade de nemátodes presentes nos diferentes componentes dos indivíduos.

A quantificação dos nemátodes nestes diferentes constituintes foi realizada no Laboratório de Nematologia, Departamento de Ciências da Vida, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

## **2.6 Tratamento Estatístico**

Para a realização dos testes estatísticos utilizou-se o programa STATISTICA versão 11, da StatSoft Inc. (2012). Para a análise dos dados realizou-se testes ANOVAR nos parâmetros fisiológicos e ANOVA factorial no crescimento relativo. Utilizando Teste de Tukey HSD para os testes post-hoc.

Realizou-se o teste dos pressupostos da homocedasticidade de variância e da normalidade através de testes de Levene e o teste de Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando os resultados não apresentavam homocedasticidade de variância e normalidade, efectuou-se uma transformação logarítmica. Apesar da transformação, os dados continuaram a apresentar o incumprimento de pressupostos.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Efeito do Stress Hídrico no potencial de infecção, a 20°C

#### 3.1.1 Relações Hídricas e Trocas Gasosas

De acordo com os resultados apresentados na figura 7, observa-se que os indivíduos submetidos a stress hídrico apresentam valores significativamente inferiores de potencial hídrico de base ( $\Psi_b$ ) e potencial hídrico de mínimo ( $\Psi_{\min}$ ) que os indivíduos com elevada disponibilidade hídrica em ambas as espécies (Figura 7 e Tabela 1). Sendo esta diferença superior em *P. radiata* que em *P. pinaster*. Estes resultados são de esperar uma vez que, de acordo com os registos do conteúdo hídrico do solo, pode-se observar uma diferença significativa entre o conteúdo hídrico do solo com e sem stress hídrico, com os indivíduos com disponibilidade hídrica elevada a apresentar um valor, em média, 118% e 69% superior aos indivíduos sujeitos a stress hídrico, em *P. radiata* e *P. pinaster* respectivamente (Figura 4). Observa-se também que os indivíduos submetidos a stress hídrico e inoculados com o nemátode apresentam um decréscimo significativo de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{\min}$ . Esta descida ocorre quando os danos provocados pelo nemátode, levam à interrupção da circulação de água pelo xilema (Fukuda, 1997), impossibilitando a medição do  $\Psi_b$  e  $\Psi_{\min}$ <sup>5</sup>. O efeito combinado de stress hídrico, nemátode e tempo só é significativo no  $\Psi_b$  de *P. pinaster*. Não sendo significativo no  $\Psi_b$  de *P. radiata* e no  $\Psi_{\min}$  de ambas as espécies devido à grande variância nos resultados, sendo esta grande variância o resultado da grande heterogeneidade da resposta à infecção de cada indivíduo (Ver Capítulo 3.1.3 para mais detalhes).

No caso dos indivíduos com uma elevada disponibilidade hídrica, em ambas as espécies, observa-se que estes apresentam valores relativamente constantes de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{\min}$  ao longo de todo o período que decorreu este trabalho, independentemente de estarem inoculados com nemátode ou não, indicando que não ocorreu o desenvolvimento da doença nestas condições.

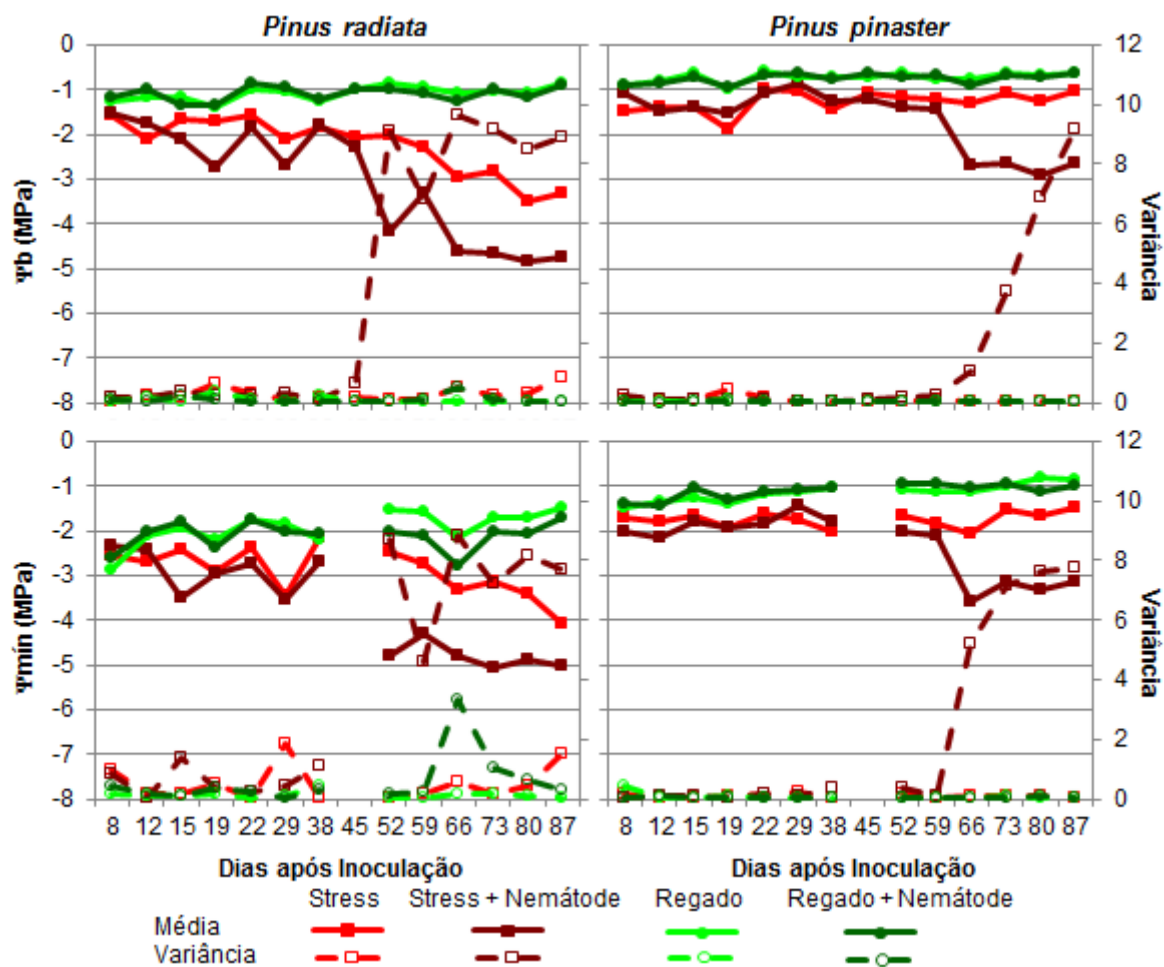
Em relação aos parâmetros relacionados com as trocas gasosas, observa-se que, tal como no  $\Psi_b$  e  $\Psi_{\min}$ , que o stress hídrico tem um efeito significativo na transpiração (E), condutância estomática (G) e fotossíntese (A) (Figura 8 e Tabela 2). Tendo os indivíduos submetidos a stress hídrico apresentado valores significativamente inferiores relativamente aos indivíduos com uma elevada disponibilidade hídrica. Sendo de notar que *P. radiata* apresenta taxas de transpiração, condutância

---

<sup>5</sup> Tendo-se atribuído o valor de -8MPa a estes indivíduos, porque este era o valor mais baixo medível com agulhas de pinheiro na câmara de Scholander e o valor mais baixo medido com sucesso num indivíduo foi de -7MPa. De acordo com Bowe (2010), Diehr et al. (2004) e Diehr (2013) é necessário incluir estes indivíduos mortos em estudos longitudinais para não enviesar os resultados.

estomática e fotossíntese significativamente superiores a *P. pinaster* em situação de elevada disponibilidade hídrica. Não se observa o efeito da doença em nenhum tratamento inoculado (Figura 8), porque esta só se manifestou nos valores de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$  a partir dos 52 e 66 dias após inoculação, em *P. radiata* e *P. pinaster* respectivamente (Figura 7), e infelizmente devido a avaria do equipamento não se pôde efectuar medições destes parâmetros depois dos 52 dias após inoculação. De acordo com Fukuda (1997) alterações de E, G e A são uma consequência da perda de circulação de água pelo xilema, sendo este medido neste trabalho através de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$ . Sendo por isso de esperar que só se observe alterações em E, G e A simultaneamente ou após alterações no  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$ .

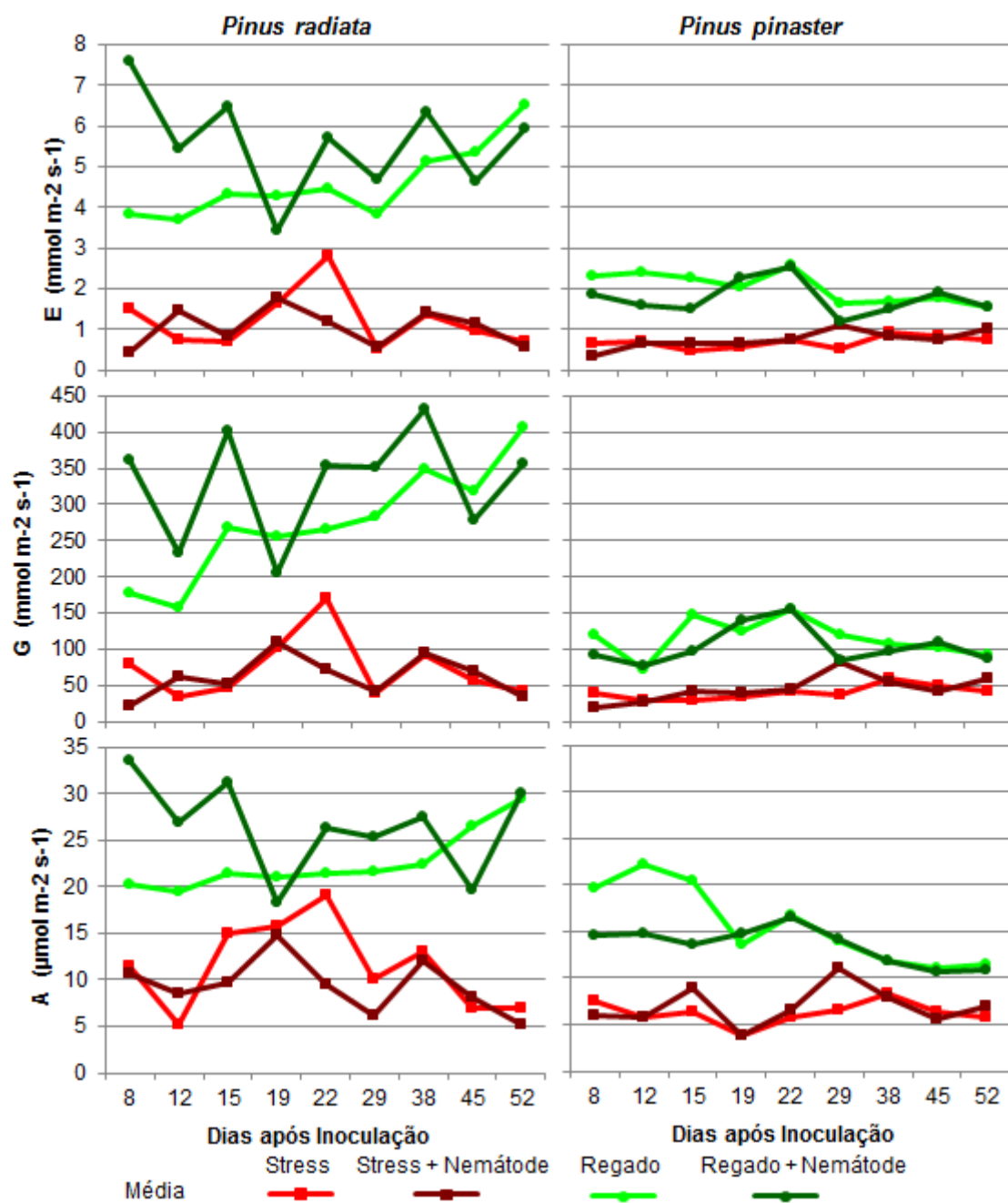
Ao analisar o teste ANOVAR (Tabela 1) e os testes post-hoc em  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$ , pode-se concluir que o  $\Psi_b$  é o parâmetro que melhor discrimina o desenvolvimento da doença. Sendo este resultado esperado uma vez que  $\Psi_b$  está mais dependente das condições do conteúdo hídrico do solo e do estado da saúde do indivíduo e  $\Psi_{mín}$  está não só dependente destas condições como também das condições ambientais apresentando por isso maior variabilidade.



**Figura 7** – Variação do Potencial Hídrico de base ( $\Psi_b$ ) e do Potencial Hídrico mínimo ( $\Psi_{mín}$ ) de *P. radiata* e *P. pinaster* no período pós-inoculação (n=4/5).

**Tabela 1** – Resultado do teste ANOVAR para o Potencial Hídrico de base ( $\Psi_b$ ) e do Potencial Hídrico mínimo ( $\Psi_{mín}$ ) de *P. radiata* e *P. pinaster*, com os factores Disponibilidade Hídrica (D), Presença de Nemátode (N) e Tempo (T) e as suas interações. Os valores significativos estão assinalados a negro ( $p \leq 0,05$ ) (n=4/5).

	$\Psi_b$				$\Psi_{mín}$			
	<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>		<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
<b>D</b>	72,213	<b>0,000</b>	103,181	<b>0,000</b>	24,743	<b>0,001</b>	149,311	<b>0,000</b>
<b>N</b>	1,692	0,214	3,761	0,072	0,709	0,424	2,249	0,160
<b>D*N</b>	1,371	0,261	2,505	0,134	0,465	0,514	3,797	0,075
<b>T</b>	4,516	<b>0,000</b>	5,734	<b>0,000</b>	1,735	0,071	3,845	<b>0,000</b>
<b>T*D</b>	8,941	<b>0,000</b>	3,098	<b>0,000</b>	5,340	<b>0,000</b>	3,127	<b>0,001</b>
<b>T*N</b>	1,094	0,367	3,463	<b>0,000</b>	0,952	0,500	1,774	0,058
<b>T*D*N</b>	0,594	0,857	2,805	<b>0,001</b>	0,801	0,648	0,861	0,588



**Figura 8** – Variação da Transpiração (E), Condutância Estomática (G) e Fotossíntese (A) em *P. radiata* e *P. pinaster* no período pós-inoculação (n=3-5)

### 3.1.2 Índices fisiológicos

Os resultados apresentados na figura 9 expressam a evolução da eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm) e dos índices de reflectância sPRI e ND705 ao longo do tempo após a inoculação para os diferentes tratamentos de *P. radiata* e *P. pinaster*.

O Fv/Fm indica o funcionamento do fotossistema II através da medição do rendimento quântico, apresenta valores máximos entre 0,8 e 0,833, sendo que os valores abaixo são indicativos de problemas no funcionamento do fotossistema II (Schulze & Caldwell, 1995). O parâmetro sPRI está correlacionado com a eficiência do uso da radiação fotossinteticamente activa, a fotossíntese e eficiência fotoquímica efectiva (Gamon et al., 1997; Peñuelas et al., 1998; Letts et al., 2008), enquanto o ND705 correlaciona-se com a concentração de clorofila nas folhas (Sims & Gamon, 2002; Letts et al., 2008).

Relativamente a Fv/Fm, observa-se que os indivíduos submetidos a stress hídrico e inoculados com o nemátode apresentam valores significativamente inferiores aos outros tratamentos, sendo esta diferença mais acentuada em *P. radiata* que em *P. pinaster* (Figura 9 e Tabela 3). Também se observa que os indivíduos submetidos a stress hídrico mas não inoculados, em *P. radiata*, apresentam valores ligeiramente inferiores (sem valor estatístico) que os indivíduos com uma elevada disponibilidade hídrica. Esta tendência poderá estar relacionada com o decréscimo mais acentuado do  $\Psi_b$  e do  $\Psi_{mín}$ , o qual foi suficiente para afectar ligeiramente o funcionamento dos fotossistemas. Esta tendência não se observa em *P. pinaster*, sendo indicativo que o stress hídrico, em *P. pinaster*, não afectou o funcionamento dos fotossistemas. Por fim, observa-se que os indivíduos com elevada disponibilidade hídrica, em ambas as espécies, apresentam valores semelhantes e constantes ao longo do período pós inoculação e superiores a 0,8 indicando que nestas condições os indivíduos não apresentavam qualquer indício de stress resultante do desenvolvimento da doença. Tal como se observou para o  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$  também se verificou um aumento acentuado da variância neste parâmetro a partir dos 52 após a inoculação em ambas as espécies.

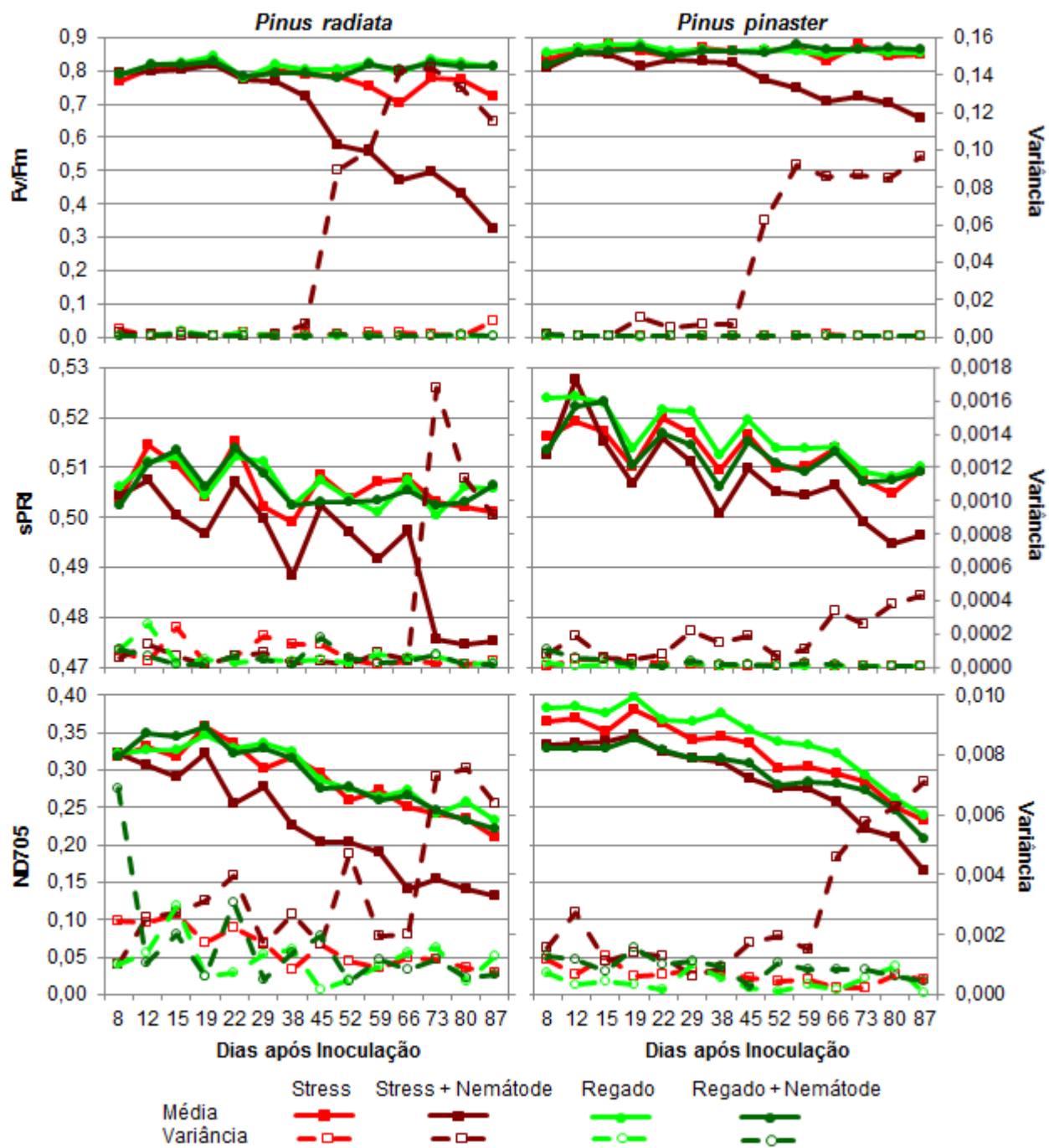
Ao analisar o sPRI, observa-se que em ambas as espécies, os indivíduos submetidos a stress hídrico e inoculados pelo nemátode se destacam por apresentarem valores significativamente inferiores aos outros indivíduos, portanto uma redução na eficiência do uso da radiação fotossinteticamente activa traduzindo-se numa redução na eficiência fotoquímica efectiva (Figura 9 e Tabela 3). Sendo esta diferença superior em *P. radiata* que em *P. pinaster*. Ao contrário do Fv/Fm, não se observa, em *P. radiata*, uma redução nos valores de sPRI nos indivíduos submetidos a stress hídrico relativamente aos indivíduos com uma disponibilidade hídrica elevada, sugerindo que este parâmetro é menos sensível a alterações no fotossistema que o Fv/Fm. Observa-se também que os indivíduos com elevada disponibilidade hídrica apresentam valores semelhantes, independentemente de estarem ou não inoculados com o nemátode, indicando que a doença não se desenvolveu nestas condições.



Quanto ao ND705, observa-se que os indivíduos submetidos a stress hídrico e inoculados pelo nemátode se destacam por apresentarem valores significativamente inferiores aos outros indivíduos, em ambas as espécies indicando uma redução da concentração de clorofila nas folhas (Figura 9 e Tabela 3). Esta diferença é superior em *P. radiata* e acontece mais rapidamente do que em *P. pinaster*. Observa-se que o efeito combinado do stress hídrico, nemátode e tempo só é significativo no caso de *P. pinaster*. Não sendo significativo em *P. radiata* devido à maior variância que se observa relativamente a *P. pinaster*, não só nos indivíduos submetidos a stress hídrico e inoculados com o nemátode mas também nos indivíduos submetidos aos outros tratamentos. Apesar desta maior variância, observa-se que em *P. radiata* o efeito combinado do nemátode e do tempo e o efeito combinado do stress hídrico e do tempo são significativos. Tal como no sPRI e ao contrário do Fv/Fm, em *P. radiata*, não se observa uma redução nos valores de ND705 nos indivíduos submetidos a stress hídrico relativamente aos indivíduos com uma disponibilidade hídrica elevada, sugerindo que o stress hídrico afectou ligeiramente o funcionamento dos fotossistemas mas não a quantidade de clorofila presente nas folhas. Observa-se também que os indivíduos com elevada disponibilidade hídrica apresentam valores semelhantes, independentemente de estarem ou não inoculados com o nemátode, indicando que a doença não se desenvolveu nestas condições.

Através da análise do teste ANOVAR (Tabela 3) e dos testes post-hoc em Fv/Fm, sPRI e do ND705, pode-se concluir que destes parâmetros o Fv/Fm é aquele que globalmente não só permite uma melhor discriminação do estado de saúde dos indivíduos como também permite observar o efeito da doença mais precocemente. Confirmando que este parâmetro largamente utilizado pela comunidade científica (Schulze & Caldwell, 1995) é o melhor dentro dos índices relacionados com a clorofila. De facto quer o  $\Psi_b$  quer o Fv/Fm são parâmetros determinados antes do sol nascer apresentando valores intrínsecos à própria planta e independentes da variação das condições ambientais que ocorrem durante o dia, permitindo uma menor variabilidade e portanto uma melhor discriminação de qualquer stress.

Contudo em *P. radiata* observa-se que o ND705 talvez tenha algum potencial como indicador do desenvolvimento da doença da murchidão do pinheiro, sendo necessário estudar mais profundamente este parâmetro.



**Figura 9** – Variação do Fv/Fm, sPRI e ND705 de *P. radiata* e *P. pinaster* no período pós-inoculação (n=8)

**Tabela 3** – Resultado do teste ANOVAR para o Fv/Fm, sPRI e o ND705 de *P. radiata* e *P. pinaster*, com os factores Disponibilidade Hídrica (D), Presença de Nemátode (N) e Tempo (T) e as suas interações. Os valores significativos estão assinalados a negrito ( $p \leq 0,05$ ).

	Fv/Fm				sPRI				ND705			
	<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>		<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>		<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
<b>D</b>	12,447	<b>0,001</b>	1,975	0,172	9,049	<b>0,006</b>	4,234	<b>0,049</b>	17,442	<b>0,000</b>	2,908	0,099
<b>N</b>	6,377	<b>0,018</b>	1,848	0,186	8,735	<b>0,006</b>	4,400	<b>0,045</b>	12,800	<b>0,001</b>	19,627	<b>0,000</b>
<b>D*N</b>	5,159	<b>0,031</b>	1,487	0,234	7,581	<b>0,010</b>	0,191	0,665	11,514	<b>0,002</b>	0,191	0,666
<b>T</b>	8,487	<b>0,000</b>	2,061	<b>0,019</b>	2,907	<b>0,000</b>	3,032	<b>0,000</b>	4,408	<b>0,000</b>	1,759	<b>0,048</b>
<b>T*D</b>	8,757	<b>0,000</b>	1,909	<b>0,033</b>	2,847	<b>0,001</b>	1,428	0,144	2,121	<b>0,013</b>	1,126	0,335
<b>T*N</b>	4,555	<b>0,000</b>	0,903	0,544	1,481	0,122	2,556	<b>0,002</b>	2,701	<b>0,001</b>	0,548	0,894
<b>T*D*N</b>	4,568	<b>0,000</b>	2,094	<b>0,017</b>	2,047	<b>0,017</b>	2,771	<b>0,001</b>	1,264	0,233	2,263	<b>0,007</b>

### 3.1.3 Sintomatologia e Quantificação de Nemátodes

Após a inoculação do nemátode, determinou-se regularmente o estágio fitossanitário através da análise sintomatológica dos indivíduos (Tabela 4 e 5, *P. radiata* e *P. pinaster* respectivamente). Com vista à quantificação do número de nemátodes, recorreu-se à contagem dos nemátodes presentes nos ramos, tronco, caule subterrâneo e nas raízes (Tabela 4 e 5, *P. radiata* e *P. pinaster* respectivamente), o que permitiu determinar a relação entre a mortalidade e a percentagem de indivíduos com presença confirmada de *B. xylophilus* para os diferentes tratamentos, em ambas as espécies (Tabela 6).

Observa-se que tanto em *P. radiata* como em *P. pinaster*, os indivíduos sujeitos a stress hídrico inoculados com o nemátode apresentam o maior desenvolvimento da doença, com *P. radiata* a apresentar um desenvolvimento mais rápido e severo que *P. pinaster* (Tabela 4 e 5), com uma mortalidade de 75% e 37,5% respectivamente (Tabela 6). Observa-se também, que os indivíduos com elevada disponibilidade hídrica não apresentam um desenvolvimento significativo da doença (estágio III ou superior), em ambas as espécies, embora se registre a presença de nemátode durante o período de estudo não foi observada qualquer mortalidade (Tabela 6). Indicando que o stress hídrico tem uma forte influência no desenvolvimento da doença da murchidão do pinheiro. Apesar desta ausência de desenvolvimento da doença, observa-se que a grande maioria dos indivíduos em *P. radiata* apresentam nemátodes nos seus tecidos, ainda que em número reduzido, enquanto *P. pinaster* apresenta somente um indivíduo com nemátodes nos seus tecidos (Tabela 4, 5 e 6). Podendo-se inferir que *P. pinaster* apresente uma melhor capacidade de suprimir o desenvolvimento de *B. xylophilus* que *P. radiata*, uma vez que mesmo em condições favoráveis a grande maioria de *P. radiata* apresente nemátodes nos seus tecidos. Por outro lado, como *P. radiata* é naturalmente mais vulnerável a stress hídrico que *P. pinaster* (Ver capítulo 3.1.1), sendo por isso mais vulnerável à cavitação do xilema, *P. radiata* é menos resistente aos danos provocados durante a alimentação do nemátode.

Por fim observa-se que existe uma forte correspondência entre indivíduos com estádios fitossanitários elevados (estádio III ou superior) e números elevados de nemátodes. Observando-se que a grande maioria dos nemátodes se encontra no tronco e no caule subterrâneo dos indivíduos, com um número reduzido nos ramos e raízes. Em nenhum tratamento se detectou *B. xylophilus* no solo.

Tal como seria de esperar nas árvores não inoculadas com nemátode não foi detectada a sua presença em nenhuma das espécies estudadas.

**Tabela 4** – Sintomatologia ao longo do período pós-inoculação e contagem final de Nemátodes nos ramos, tronco, caule subterrâneo (Caule subt.) e raízes, em *P. radiata*.

**Estádio 0** **Estádio I** **Estádio II** **Estádio III** **Estádio IV** **Estádio V**



	Período de medições ecofisiológicas																Período pós- medições ecofisiológicas		Nº nemátodes/ 10g				Nº nemátodes Total			
	Dias após Inoculação																		Ramos	Tronco	Caule subt.	Raízes	Ramos	Tronco	Caule subt.	Raízes
	8	12	15	19	22	29	38	45	52	59	66	73	80	87	93	100	107	Abate								
Stress																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
Stress +Nemátode																			7	26	443	19	9	318	861	79
																			0	3185	2705	213	0	28894	7663	845
																			0	267	3314	16	0	1586	4713	32
																			0	9434	9858	2	0	50236	12461	3
																			2	1898	8568	119	1	16938	16733	353
																			0	3830	6667	2	0	20716	13627	3
																			0	553	4437	16	0	3207	7565	35
																			5	4598	4979	107	2	37662	7722	225
Regado																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
Regado +Nemátode																			0	1	0	4	0	8	0	10
																			0	0	0	2	0	0	0	5
																			0	0	6	121	0	0	19	1038
																			0	3	0	0	0	43	0	0
																			0	4	0	1	0	48	0	4
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	1	0	35	0	13	0	93
																			0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 5** – Sintomatologia ao longo do período pós-inoculação e contagem final de Nemátodes nos ramos, tronco, caule subterrâneo (Caule subt.) e raízes, em *P. pinaster*.

	Período de medições ecofisiológicas																Período pós- medições ecofisiológicas		Nº nemátodes/ 10g				Nº nemátodes Total			
	Dias após Inoculação																									
	8	12	15	19	22	29	38	45	52	59	66	73	80	87	93	100	107	Abate								
Stress																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
Stress +Nemátode																			104	8390	1769	33	431	162263	8944	128
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	1060	51	8	0	10851	104	8
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	2164	242	28	0	28617	678	102
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	560	8	0	0	28180	53	0
Regado																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
Regado +Nemátode																			1	0	0	0	10	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0
																			0	0	0	0	0	0	0	0

**Tabela 6** – Mortalidade final e presença de nemátode (indivíduos com presença confirmada de nemátode no final do trabalho) em *P. radiata* e *P. pinaster* em todos os tratamentos realizados (n=8)

	<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>	
	Mortalidade (%)	Presença de nemátode (%)	Mortalidade (%)	Presença de nemátode (%)
Stress	0	0	0	0
Stress+Nemátode	75	100	37,5	50
Regado	0	0	0	0
Regado+Nemátode	0	75	0	12,5

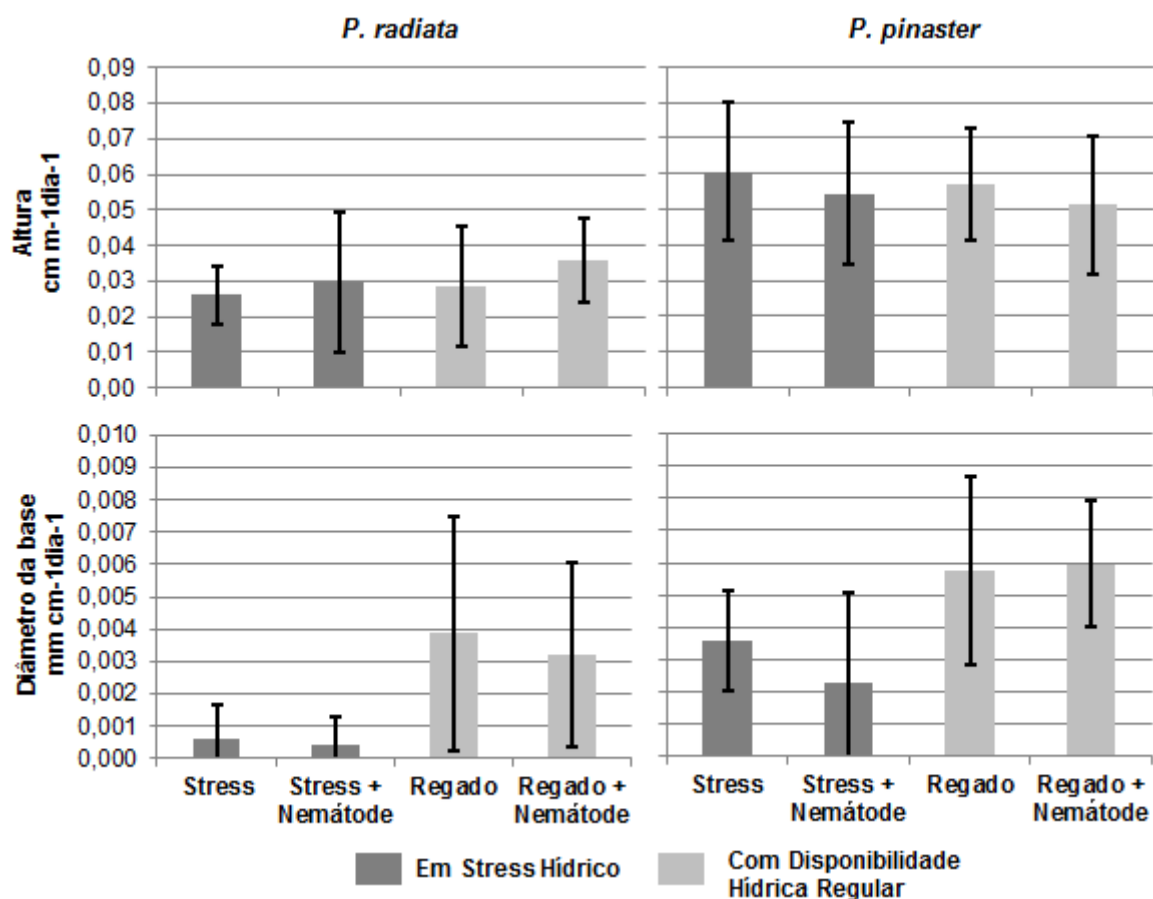
### 3.1.4 Crescimento Relativo

A taxa de crescimento relativo (RGR) foi determinada através da medição da altura, e do diâmetro do tronco na base nas duas espécies e ainda do comprimento dos ramos e do diâmetro da base dos ramos no caso de *P. pinaster* no início e no final do período de estudo. (Figuras 10 e 11).

A análise do crescimento figura 10, demonstra que *P. pinaster* apresenta taxas de crescimento superiores a *P. radiata* e que, em ambas a espécies, o RGR de altura não apresenta diferenças entre os vários tratamentos (Tabela 7). No RGR do diâmetro da base nota-se um claro efeito do Stress hídrico (Tabela 7), com um crescimento significativamente inferior no caso dos indivíduos sujeitos a stress hídrico, tanto em *P. radiata* como em *P. pinaster*. Os tratamentos com nemátode não induziram qualquer alteração nos crescimentos.

No desenvolvimento dos ramos em *P. pinaster* (Figura 11) observa-se que o RGR não apresenta diferenças em relação ao comprimento dos ramos (Tabela 8), no entanto o RGR do diâmetro dos ramos foi afectado pelo stress hídrico apresentando um crescimento significativamente inferior (Tabela 8).

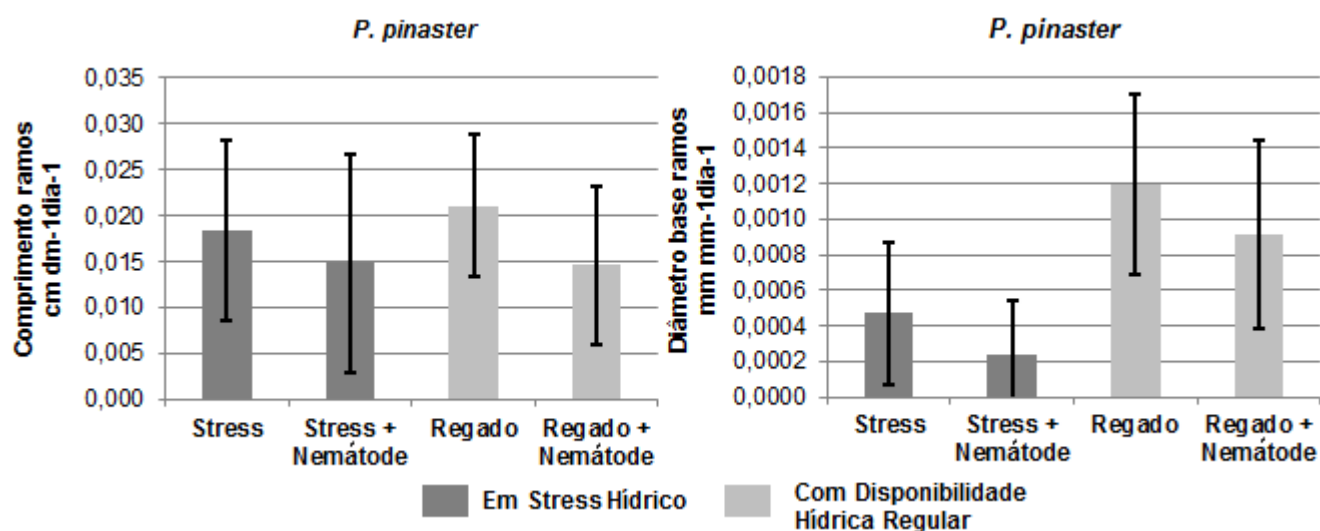
Com base nestes resultados, pode-se concluir que o crescimento foi afectado somente pelo stress hídrico e não pela infecção do nemátode e que o stress hídrico diminui o crescimento radial, mas não o crescimento em altura e comprimento dos ramos, confirmando estudos anteriores realizados em pinheiros (Sadanandan Nambiar, 1990; Lebourgeois et al., 1998; Oberhuber et al., 1998).



**Figura 10** – Taxa de crescimento relativo (RGR), da altura e diâmetro da base de *P. radiata* e *P. pinaster*, média e desvio-padrão (n=7/8)

**Tabela 7** – Resultado do teste ANOVA para o RGR da Altura e do Diâmetro da base de *P. radiata* e *P. pinaster*, com os factores Disponibilidade Hídrica (D), Presença de Nemátode (N) e as suas interacções. Os valores significativos estão assinalados a negrito ( $p \leq 0,05$ ).

	RGR Altura				RGR Diâmetro da base			
	<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>		<i>P. radiata</i>		<i>P. pinaster</i>	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
<b>D</b>	0,658	0,424	0,250	0,621	12,692	<b>0,001</b>	12,061	<b>0,002</b>
<b>N</b>	1,107	0,302	0,761	0,391	0,243	0,626	0,403	0,531
<b>D*N</b>	0,127	0,725	0,000	0,982	0,069	0,795	0,806	0,377



**Figura 11** – Taxa de crescimento relativo (RGR), do comprimento dos ramos e diâmetro da base dos ramos de *P. pinaster*, média e desvio-padrão (n=7/8)

**Tabela 8** – Resultado do teste ANOVA para o RGR do comprimento dos ramos e do Diâmetro da base de ramos de *P. pinaster*, com os factores Disponibilidade Hídrica (D) e Presença de Nemátode (N) e as suas interacções. Os valores significativos estão assinalados a negrito ( $p \leq 0,05$ ).

	RGR Comprimento ramos <i>P. pinaster</i>		RGR Diâmetro base Ramos <i>P. pinaster</i>	
	F	p-value	F	p-value
<b>D</b>	0,125	0,726	19,507	<b>0,000</b>
<b>N</b>	2,106	0,158	2,669	0,114
<b>D*N</b>	0,166	0,687	0,031	0,861



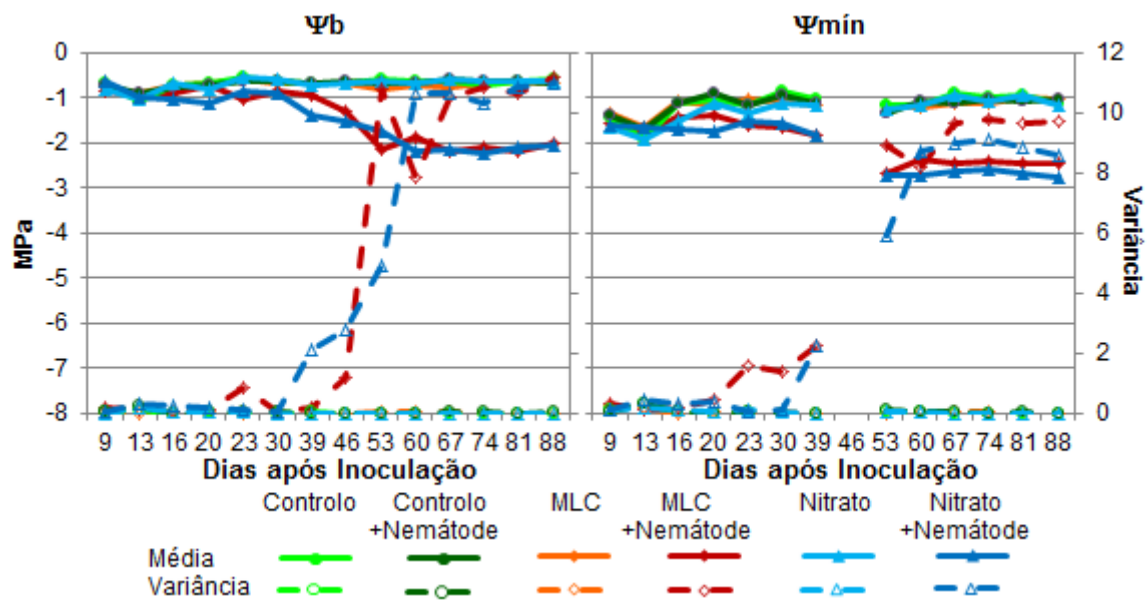
## 3.2 Efeito da fertilização do solo no potencial de infecção, a 25°C

### 3.2.1 Relações Hídricas

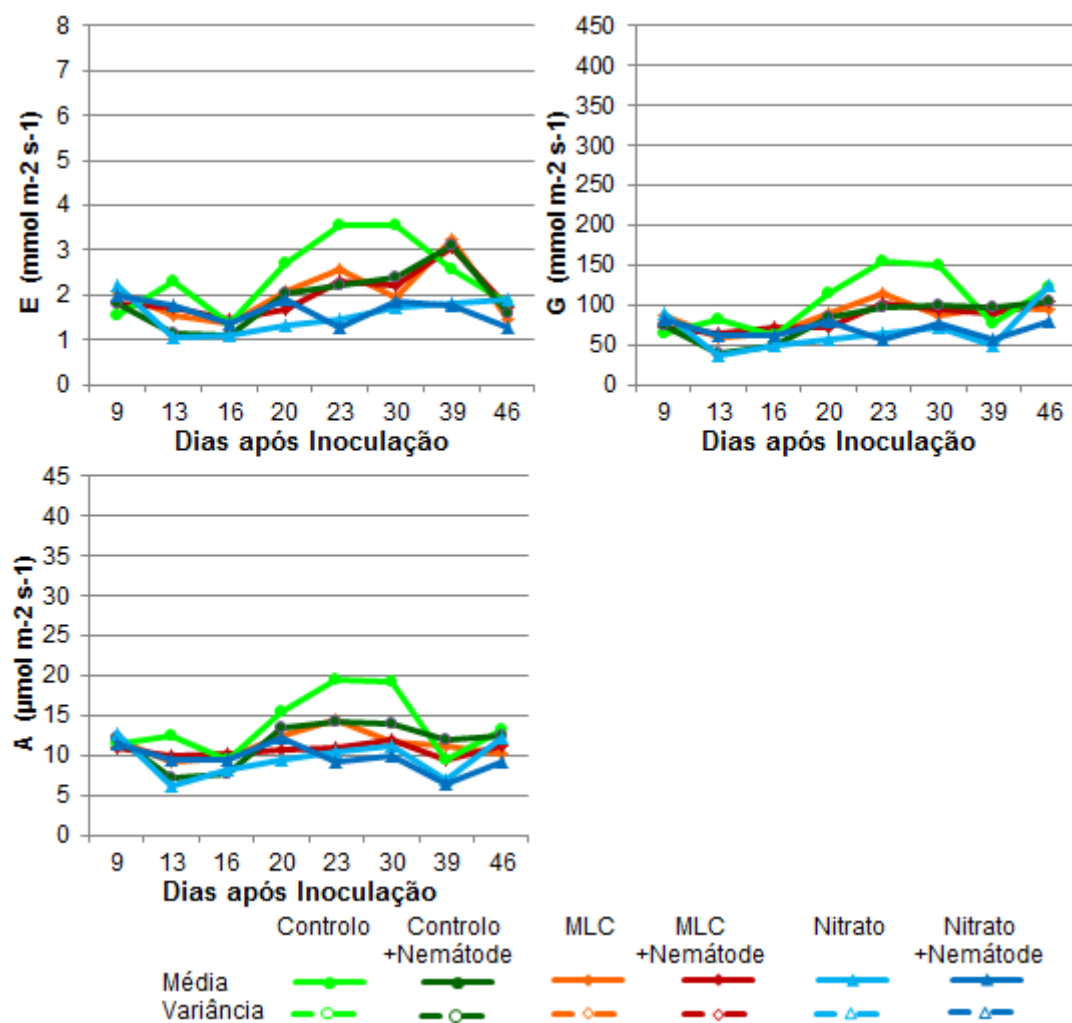
Relativamente ao efeito da fertilização do solo, e de acordo com os resultados apresentados na figura 12, observa-se que os indivíduos com a adição de nitrato de amónia no solo e com a adição de Monty's Liquid Carbon (MLC) e inoculados com nemátodes apresentam uma redução significativa de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$  (Figura 12), acompanhado por um aumento claro da variância a partir dos 39 dias após inoculação. Sendo o efeito combinado de nemátode e tempo significativo no  $\Psi_{mín}$  mas não no  $\Psi_b$  (Tabela 9), provavelmente como resultado da maior variância nos resultados de  $\Psi_b$ .

Observa-se que indivíduos sem adição de fertilizante e inoculados com o nemátode não apresentam um decréscimo de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$ , apesar de se observar um desenvolvimento da doença idêntico aos indivíduos com adição de MLC e inoculados com o nemátode (Ver Capítulo 3.2.3, Tabela 11). Esta discrepância ocorre porque não se pôde realizar a medição de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$  a todos os 8 indivíduos de cada tratamento, tendo-se escolhido ao acaso 5 dos 8 para realizar estas medições e infelizmente o indivíduo que desenvolveu a doença se encontra entre estes 5. Tendo presente este facto, seria de esperar que os indivíduos sem adição de fertilizante e inoculados com o nemátode apresentassem um padrão semelhante de  $\Psi_b$  e  $\Psi_{mín}$  que os indivíduos com adição de MLC e inoculados com o nemátode. Com base nestes resultados, pode-se inferir que a doença apresenta um desenvolvimento semelhante independentemente da existência ou não de fertilizante. No entanto, o reduzido número de indivíduos que desenvolveram a doença impossibilita conclusões robustas.

Em relação aos parâmetros relacionados com as trocas gasosas (Figura 13), observa-se que todos os indivíduos apresentam valores semelhantes de condutância estomática (G) e fotossíntese (A), sendo só o efeito do tempo significativo. Relativamente à transpiração (E) observa-se que os indivíduos sem adição de fertilizante e não inoculados com o nemátode apresentam valores superiores aos outros indivíduos (Figura 13 e Tabela 9). Não se observa o efeito do nemátode nestes parâmetros porque não se pôde realizar a medição destes passados os 46 dias após inoculação. Por outro lado como já foi referido anteriormente estes parâmetros estão dependentes das condições ambientais presentes durante a medição, como a radiação e o défice de pressão de vapor que podem variar instantaneamente, alterando os valores das taxas de transpiração e fotossíntese.



**Figura 12** – Variação do Potencial Hídrico de base ( $\Psi_b$ ) e do Potencial Hídrico mínimo ( $\Psi_{mín}$ ) no período pós-inoculação (n=5).



**Figura 13** – Variação da Transpiração, da Condutância estomática e da Fotossíntese após a inoculação com o nemátode

**Tabela 9** – Resultado do teste ANOVAR do Potencial hídrico de base ( $\Psi_b$ ), do Potencial Hídrico mínimo ( $\Psi_{mín}$ ), da Transpiração (E), Condutância estomática (G) e da Fotossíntese (A) com os factores Fertilizante (F), Presença de Nemátode (N) e Tempo (T) e as suas interacções. Os valores significativos estão assinalados a negrito ( $p \leq 0,05$ ).

	$\Psi_b$		$\Psi_{mín}$		E		G		A	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
<b>F</b>	0,911	0,416	1,718	0,201	1,686	0,206	2,335	0,118	2,361	0,116
<b>N</b>	2,617	0,119	3,365	0,079	0,771	0,389	0,713	0,407	0,680	0,418
<b>F*N</b>	0,618	0,548	0,787	0,467	0,434	0,653	0,630	0,541	0,286	0,754
<b>T</b>	1,668	0,067	6,086	<b>0,000</b>	7,522	<b>0,000</b>	6,922	<b>0,000</b>	6,940	<b>0,000</b>
<b>T*F</b>	0,698	0,864	0,846	0,676	2,102	<b>0,014</b>	1,720	0,056	1,712	0,057
<b>T*N</b>	1,568	0,093	2,693	<b>0,002</b>	0,576	0,775	0,646	0,718	0,807	0,582
<b>T*F*N</b>	0,556	0,963	0,714	0,837	1,031	0,425	1,035	0,421	1,135	0,331

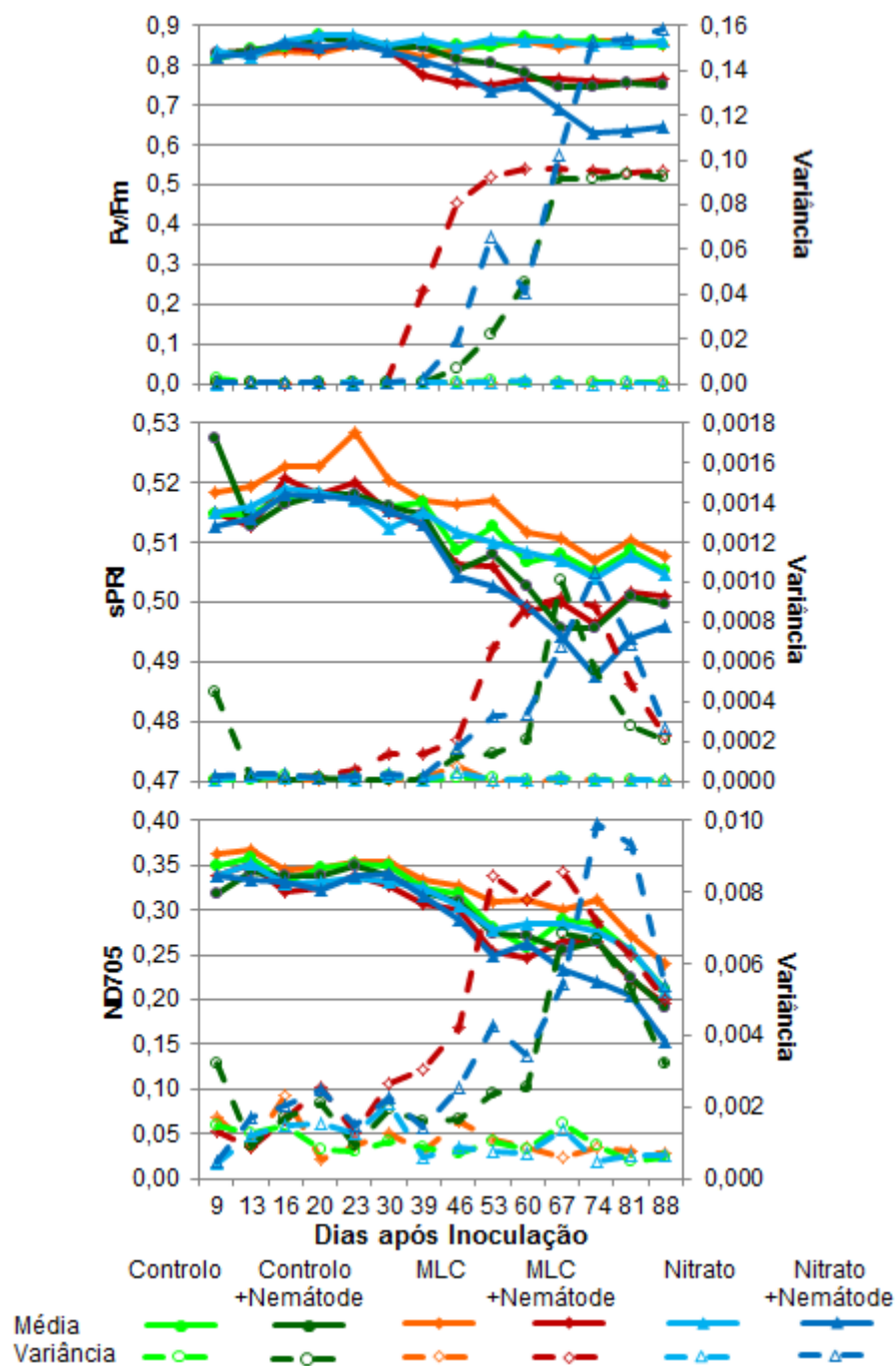
### 3.2.2 Índices fisiológicos

Após a análise dos resultados apresentados na figura 14, observa-se que em Fv/Fm, sPRI e ND705, os indivíduos inoculados com o nemátode apresentam valores significativamente inferiores aos indivíduos não inoculados com o nemátode, independentemente do tratamento aplicado ao solo, sendo o efeito combinado do nemátode e do tempo significativo em todos estes parâmetros (Figura 14 e Tabela 10).

Através do teste ANOVAR (Tabela 10) e dos teste post-hoc confirma-se que o que foi observado no capítulo 3.2.1, que a eficiência fotoquímica óptima (Fv/Fm) é o parâmetro fisiológico que permite não só uma melhor discriminação do estado de saúde dos indivíduos como também permite observar o efeito da doença mais precocemente. Nos indivíduos com MLC este efeito ocorre 39 dias após a inoculação, quando se verifica um aumento acentuado da variância, enquanto no tratamento com nitrato ou sem fertilização, o aumento da variância só se observa 46 após a inoculação.

Os outros índices estudados também mostram o mesmo efeito no mesmo período após inoculação, ou seja 30-46 dias após inoculação.

Verifica-se que nestas condições de temperaturas mais elevadas (25°C) o efeito da inoculação do nemátode no  $\Psi_b$  e no Fv/Fm se faz sentir mais precocemente (39 a 46 dias após inoculação) do que nos indivíduos inoculados a 20°C, que só começaram a apresentar sintomas e portanto redução do  $\Psi_b$  e do Fv/Fm mais tarde, 52 e 66 dias após a inoculação, respectivamente (Figura 7 e 9).



**Figura 14** – Variação do Fv/Fm, sPRI e do ND705 após a inoculação do nemátode (n=8)

**Tabela 10** – Resultados dos testes ANOVA para o Fv/Fm, sPRI e ND705, com os factores Fertilizante (F), Presença de Nemátode (N) e Tempo (T) e as suas interacções. Os valores significativos estão assinalados a negrito ( $p \leq 0,05$ ).

	Fv/Fm		sPRI		ND705	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value
<b>F</b>	0,156	0,856	0,648	0,528	0,544	0,584
<b>N</b>	3,715	0,061	4,287	<b>0,045</b>	3,555	0,066
<b>F*N</b>	0,214	0,808	0,270	0,765	0,262	0,770
<b>T</b>	2,773	<b>0,001</b>	5,394	<b>0,000</b>	4,626	<b>0,000</b>
<b>T*F</b>	0,361	0,999	0,638	0,918	1,266	0,172
<b>T*N</b>	3,516	<b>0,000</b>	3,481	<b>0,000</b>	3,413	<b>0,000</b>
<b>T*F*N</b>	0,275	1,000	0,588	0,949	1,237	0,195

### 3.2.3 Sintomatologia e Quantificação dos Nemátodes

Após a inoculação do nemátode, determinou-se regularmente o estágio fitossanitário através da análise sintomatológica dos indivíduos (Tabela 11). Com vista à quantificação do número de nemátodes, recorreu-se à contagem dos nemátodes presentes nos ramos, tronco, caule subterrâneo e nas raízes (Tabela 11), o que permitiu determinar a relação entre a mortalidade e a percentagem de indivíduos com presença confirmada de *B. xylophilus* para os diferentes tratamentos (Tabela 12).

Observa-se que os indivíduos inoculados com o nemátode apresentam um desenvolvimento semelhante da doença. Com a grande maioria dos indivíduos sem o desenvolvimento da doença e somente 1 ou 2 indivíduos com o desenvolvimento da doença, tendo estes indivíduos sucumbindo à doença ainda antes do final do trabalho (Tabela 11 e 12). Observa-se que apesar de a mortalidade ser semelhante entre os diferentes tratamentos inoculados, há um número muito superior de indivíduos infectados quando não houve a adição de fertilizante, e apesar do número de nemátodes ser considerado baixo na maioria dos indivíduos, seria possível estes indivíduos também sucumbirem à doença se as condições ambientais fossem alteradas para favorecer o nemátode.

Tal como se observou na experiência do stress hídrico, existe uma correspondência entre estádios elevados de sintomas (estádio III ou superior) e um número elevado de nemátodes.

Com base nestes resultados, confirmam-se os resultados observados nas relações hídricas e nos índices, que a doença se desenvolve de forma semelhante nos tratamentos inoculados com o nemátode, independentemente da fertilização destes. Mas o número reduzido de indivíduos com desenvolvimento da doença impossibilita conclusões definitivas.

Estádio 0   Estádio I   Estádio II   Estádio III   Estádio IV   Estádio V

32

**Tabela 12** – Mortalidade final e presença de nemátode (indivíduos com presença confirmada de nemátode no final do trabalho)

	Mortalidade (%)	Nemátode presente (%)
Controlo	0	0
Controlo+Nemátode	12,5	62,5
MLC	0	0
MLC+Nemátode	12,5	12,5
Nitrato	0	0
Nitrato+Nemátode	25	25

### 3.2.4 Crescimento Relativo

No início e final do trabalho foram medidas a altura, o diâmetro da base, o comprimento dos ramos e o diâmetro da base dos ramos, que foram utilizados para calcular a Taxa de crescimento relativo (relative growth rate - RGR) (Figura 15).

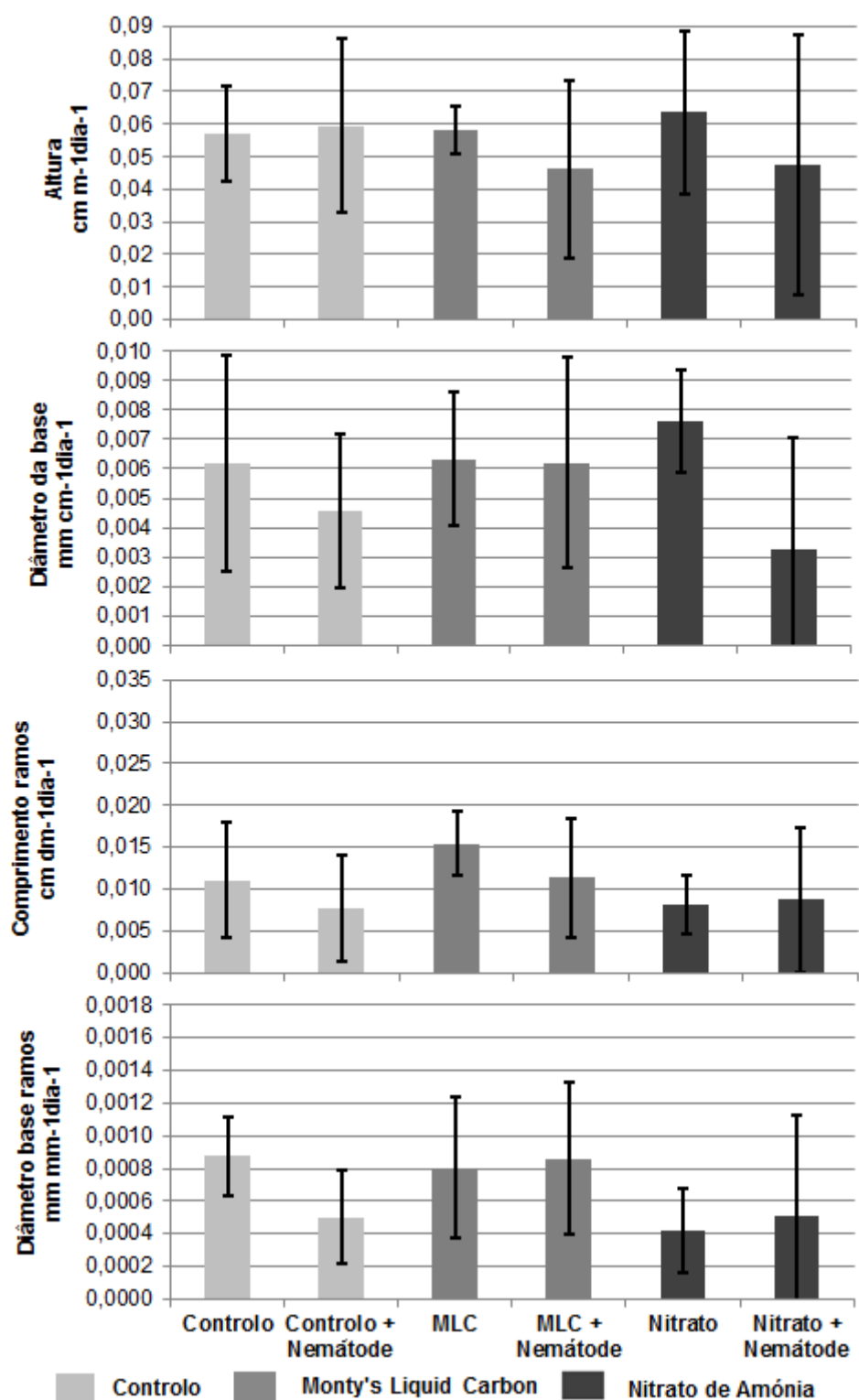
Pode-se observar que no RGR da altura e do comprimento dos ramos não há diferenças significativas entre os tratamentos. No RGR do diâmetro da base observa-se que os tratamentos inoculados com o nemátode apresentam um crescimento menor que os não inoculados. No RGR do diâmetro dos ramos é de se notar que os tratamentos submetidos a Nitrato de amónia apresentam um crescimento inferior aos submetidos a Monty's Liquid Carbon (Figura 1 e Tabela 13).

Estes resultados indicam que a fertilização do solo não tem grande efeito no crescimento de *Pinus pinaster*, com a excepção do efeito do crescimento do diâmetro dos ramos. Estes resultados contrariam resultados de outros estudos (Sadanandan Nambiar, 1990; Zas et al., 2006), podendo isto talvez se dever ao solo utilizado neste trabalho não ser pobre em nutrientes, logo não ser limitativo ao crescimento, e ao curto período de estudo deste trabalho.

Quanto ao efeito do nemátode no crescimento do diâmetro da base, é difícil avaliar o efeito deste no crescimento, uma vez que os tecidos secam num indivíduo morto pelo nemátode, logo os tecidos reduzem o seu tamanho, fazendo parecer que o indivíduo teve um crescimento mais reduzido que realmente teve.

**Tabela 13** – Resultado da ANOVA factorial do RGR da Altura, Diâmetro da base, Comprimento dos ramos e do Diâmetro da base dos ramos, com os factores Fertilizante (F) e Presença de Nemátode (N) e as suas interações. Os valores significativos estão assinalados a negrito ( $p \leq 0,05$ ).

	RGR Altura		RGR Diâmetro da base		RGR Comprimento ramos		RGR Diâmetro base Ramos	
	F	p-value	F	p-value	F	p-value	F	p-value
<b>F</b>	0,216	0,807	0,411	0,666	2,814	0,072	3,243	<b>0,049</b>
<b>N</b>	1,317	0,258	5,222	<b>0,028</b>	1,521	0,224	0,399	0,531
<b>F*N</b>	0,539	0,587	2,017	0,146	0,611	0,548	1,545	0,225



**Figura 15** – Taxa de crescimento relativo (RGR), da Altura, do Diâmetro da base, o Comprimento dos ramos e para o Diâmetro da base dos ramos de *P. pinaster*, média e desvio-padrão (n=7/8)



## 4 Considerações Finais

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que a disponibilidade hídrica é um factor crucial no desenvolvimento da doença da marchidão do pinheiro, impedindo efectivamente o desenvolvimento da doença quando a disponibilidade hídrica é elevada e a temperatura se situa na ordem dos 20°C. É também de notar que *P. radiata* apresenta uma maior susceptibilidade a *B. xylophilus* que *P. pinaster*, podendo esta maior susceptibilidade estar associada à menor resistência ao stress hídrico que *P. radiata* apresenta. Em Mendes (2012), observou-se que o stress hídrico e o aumento da temperatura não só aumentam a mortalidade mas também aceleram o desenvolvimento da doença e que, a uma temperatura ambiental média de 25°C, já ocorre uma mortalidade de 20% (em 6 semanas) quando a disponibilidade hídrica é elevada, tanto em *P. radiata* como em *P. pinaster*. Observou-se também a morte de todos os indivíduos ao fim de apenas 6 semanas, de ambas as espécies, quando estes se encontram sujeitos a stress hídrico e a uma temperatura ambiental média de 30 °C. Tendo isto em consideração é de prever que, com o aumento da temperatura prevista no âmbito das alterações climáticas, e considerando que no clima mediterrâneo o período de temperaturas elevadas corresponde também ao período de menor precipitação (Chapin et al., 2000; Sala et al., 2000; Choat et al., 2012; Engelbrecht, 2012) a severidade e propagação da doença da marchidão do pinheiro aumentem.

Neste trabalho não se observa o efeito da eutrofização do solo no desenvolvimento da doença da marchidão do pinheiro. Os tratamentos inoculados apresentaram mortalidades e comportamentos semelhantes, independentemente do tratamento aplicado ao solo, já que observámos uma mortalidade similar obtida por Mendes (2012). É provável que a disponibilidade hídrica seja um factor muito mais influente que a eutrofização do solo, e por isso o efeito benéfico da disponibilidade hídrica regular, a que os indivíduos estiveram sujeitos, se tenha sobreposto ao possível efeito dos diferentes tratamentos que se aplicaram ao solo. Sendo por isso importante estudar se em situação de stress (tanto por stress hídrico ou outro factor) a eutrofização do solo tem algum efeito no desenvolvimento da doença da marchidão dos pinheiros. Seria igualmente importante realizar estudos do efeito da eutrofização do solo que envolvam o insecto vector uma vez que alguns estudos mostram que os insectos vectores são mais atraídos por árvores fertilizadas que por árvores não fertilizadas (Zas et al., 2006; Zas et al., 2008), sendo por isso relevante verificar se o *Monochamus spp.* apresenta comportamento similar. Alguns estudos mostraram que em terrenos fertilizados, a propagação da doença é superior (Futai, 2008) e como a propagação do nemátode está dependente do vector (Aikawa, 2008; Linit & Aklulut, 2008; Tomiczek & Hoyer-Tomiczek, 2008), se a eutrofização do solo beneficiar o *Monochamus spp.* o potencial infeccioso aumentará.

Relativamente ao crescimento observou-se que o nemátode não apresentou um efeito significativo no crescimento dos indivíduos, tanto em *P. radiata* como em *P. pinaster*, que o stress hídrico diminui o crescimento radial mas não a altura e comprimento dos ramos, em ambas as espécies, e que a fertilização do solo não

afectou o significativamente o crescimento, com a excepção do nitrato de amónia que apresentou um efeito negativo no crescimento do diâmetro dos ramos que foi inferior.

Dos vários parâmetros observados durante a realização deste trabalho nenhum efectivamente detectou alterações na saúde dos indivíduos antes do desenvolvimento de sintomas notáveis. O  $F_v/F_m$  e o  $\Psi_b$  são no entanto bons indicadores de quando a doença provocada por *B. xylophilus* chegou a um ponto crítico onde será improvável que o indivíduo afectado sobreviva.

## 5 Referências Bibliográficas

- Aikawa T. 2008.** Transmission Biology of *Bursaphelenchus xylophilus* in Relation to Its Insect Vector. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 123-138.
- Akbulut S, Yuksel B, Baysal I, Vieira P, Mota M. 2008.** PineWilt Disease: A Threat to Pine Forests in Turkey?. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 59-68.
- Amaral M. 2009.** O Combate ao Nemátodo da Madeira do Pinheiro. *Voz da Terra* **58**: 9-24.
- Bowe SJ. 2010.** *Longitudinal Data Analysis: statistical methods for analysing longitudinal changes in health related quality of life which account for deaths and impute for longitudinal missing data*. Dissertação de Doutorado, Universidade de Newcastle, Austrália.
- Cabral MJ, Almeida J, Almeida PR, Dellinger T, Ferrand de Almeida N, Oliveira ME, Palmeirim JM, Queiroz AI, Rogado L, Santos-Reis M. 2006.** *Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal*. Lisboa, Portugal. Instituto da Conservação da Natureza/Assírio & Alvim.
- Cardoso JMS, Fonseca L, Abrantes I. 2012.** Direct molecular detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, from pine wood, bark and insect vector. *European Journal of Plant Pathology* **133**: 419-425.
- Chapin FS, Zavaleta ES, Eviner VT, Naylor RL, Vitousek PM, Reynolds HL, Hooper DU, Lavorel S, Sala OE, Hobbie SE, et al. 2000.** Consequences of changing biodiversity. *Nature* **405**: 234-242.
- Choat B, Jansen S, Brodribb TJ, Cochard H, Delzon S, Bhaskar R, Bucci SJ, Feild TS, Gleason SM, Hacke UG, Jacobsen AL, et al. 2012.** Global convergence in the vulnerability of forests to drought. *Nature* **491**: 752-756.
- Coombs J, Hall DO, Long SP, Scurlock JMO. 1985.** *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis*. Oxford, Reino Unido, Pergamon Press.
- Delzon S, Douthe C, Sala A, Cochard H. 2010.** Mechanism of water-stress induced cavitation in conifers: bordered pit structure and function support the hypothesis of seal capillary-seeding. *Plant, Cell and Environment* **33**: 2101-2111.
- Diehr P, Johnson LL, Patrick DL, Psaty B. 2004.** Incorporating Death into Health-Related Variables in Longitudinal Studies. *UW Biostatistics Working Paper Series* **224**.
- Diehr P. 2013.** Methods for Dealing with Death and Missing Data, and for Standardizing Different Health Variables in Longitudinal Datasets: The Cardiovascular Health Study. *UW Biostatistics Working Paper Series* **390**.
- Engelbrecht BMJ. 2012.** Forests on the brink. *Nature* **491**: 675-677.
- Fukuda K, Utsuzawa S, Sakaue D. 2007.** Correlation between acoustic emission, water status and xylem embolism in pine wilt disease. *Tree Physiology* **27**: 969-976.
- Fukuda K. 1997.** Physiological Process of the Symptom Development and Resistance Mechanism in Pine Wilt Disease. *Journal of Forest Research* **2**: 171-181.

- Futai K. 2008.** Pine Wilt in Japan: From First Incidence to the Present. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 5-12.
- Gamon JA, Serrano L, Surfus JS. 1997.** The photochemical reflectance index: an optical indicator of photosynthetic radiation use efficiency across species, functional types, and nutrient levels. *Oecologia* **112**: 492-501.
- Gu J, Zhang J, Chen X, Braasch H, Burgermeister W. 2008.** Bursaphelenchus spp. in Wood Packaging Intercepted in China. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 83-88.
- Hasegawa K, Miwa J. 2008.** Embryology and Cytology of Bursaphelenchus xylophilus. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 81-104.
- Hodda M, Smith D, Smith I, Nambiar L, Pascoe I. 2008.** Incursion Management in the Face of Multiple Uncertainties: A Case Study of an Unidentified Nematode Associated with Dying Pines Near Melbourne, Australia. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 15-40.
- Ichihara Y, Fukuda K, Suzuki K. 2000.** Early Symptom Development and Histological Changes Associated with Migration of Bursaphelenchus xylophilus in Seedling Tissues of Pinus thunbergii. *Plant Disease* **84**: 675-680.
- Ikedo T. 2008.** Control Program of Pine Wilt Disease for Landscape Conservation – The Case of Amanohashidate, Kyoto, Japan. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 397-404.
- INF5. 2010.** Direção Nacional de Gestão Florestal. *5º Inventário Nacional Florestal*. Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas.
- Karnkowski W. 2008.** Official Survey for Bursaphelenchus xylophilus Carried out on the Territory of the Republic of Poland. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 75-82.
- Lawson SA, Sathyapala S. 2008.** The Risk of PineWilt Disease to Australia and New Zealand. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 41-58.
- Lebourgeois F, Lévy G, Aussenac G, Clerc B, Willm F. 1998.** Influence of soil drying on leaf water potential, photosynthesis, stomatal conductance and growth in two black pine varieties. *Annals of Forest Science* **55**: 287-299.
- Letts MG, Phelan CA, Johnson DRE, Rood SB. 2008.** Seasonal photosynthetic gas exchange and leaf reflectance characteristics of male and female cottonwoods in a riparian woodland. *Tree Physiology* **28**: 1037-1048.
- Linit M, Akbulut S. 2008.** The Insect Vectors: Biology and Ecology. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 211-214.
- Mamiya Y. 1988.** History of Pine Wilt Disease in Japan. *Journal of Nematology* **20**: 219-226.

- Mamiya Y. 2008.** Histopathological Observations of *Bursaphelenchus xylophilus* in Symptomatic Tissues of Pinewood. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 321-334.
- Meinzer FC, Clearwater MJ, Goldstein G. 2001.** Water transport in trees: current perspectives, new insights and some controversies. *Environmental and Experimental Botany* **45**: 239–262.
- Mendes ARA. 2012.** *Avaliação das Condições Ambientais que contribuem para o estabelecimento do nemátode da madeira do pinheiro (Bursaphelenchus xylophilus)*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Mota MM, Braasch H, Bravo MA, Penas AC, Burgermeister W, Metge K, Sousa E. 1999.** First report of *Bursaphelenchus xylophilus* in Portugal and in Europe. *Nematology* **1**: 727–734.
- Mota MM, Vieira PC. 2008.** Pine Wilt Disease in Portugal. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 33-38.
- Naves PM, Sousa E, Rodrigues JM. 2008.** Biology of *Monochamus galloprovincialis* (Coleoptera, Cerambycidae) in the Pine Wilt Disease Affected Zone, Southern Portugal. *Silva Lusitana* **16**: 133-148.
- Oberhuber W, Stumböck M, Kofler W. 1998.** Climate-tree-growth relationships of Scots pine stands (*Pinus sylvestris* L.) exposed to soil dryness. *Trees* **13**: 19-27.
- Peñuelas J, Filella I, Llusia J, Siscart D, Pinol J. 1998.** Comparative field study of spring and summer leaf gas exchange and photobiology of the mediterranean trees *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*. *Journal of Experimental Botany* **49**: 229-238.
- Proença DN, Francisco R, Snatos CV, Lopes A, Fonseca L, Abrantes IMO., Morais PV. 2010.** Diversity of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and other nematodes isolated from *Pinus pinaster* trees with Pine Wilt Disease. *PLoS ONE* **5**: e15191.
- Rodrigues JM. 2008.** National Eradication Programme for the Pinewood Nematode. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 5-14.
- Rutherford TA, Webster JM. 1987.** Distribution of pine wilt disease with respect to temperature in North America, Japan, and Europe. *Canadian Journal Forest Research*, **17**: 1050-1059.
- Sadanandan Nambiar EK. 1990.** Management of forests under nutrient and water stress. *Water, Air, and Soil Pollution* **54**: 209-230.
- Sala OE, Chapin FS, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson RB, Kinzig A, Leemans R, et al. 2000.** Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science* **287**: 1770-1774.
- Schönfeld U, Braasch H, Burgermeister W, Brother H. 2008.** Investigations on Wood-Inhabiting Nematodes of the Genus *Bursaphelenchus* in Pine Forests in the Brandenburg Province, Germany. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 69-74.
- Schulze ED, Caldwell MM. 1995.** *Ecophysiology of Photosynthesis*. Heilderberg, Alemanha, Springer.
- Shin S. 2008.** Pine Wilt Disease in Korea. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 26-32.

- Sims DA, Gamon JA. 2002.** Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. *Remote Sensing of Environment* **81**: 337-354.
- Sriwati R, Takemoto S, Futai K. 2008.** The Relationship Between the Pinewood Nematode (PWN) and Fungi Cohabiting in Pine Trees Inoculated with the PWN. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 101-114.
- Sutherland JR. 2008.** A Brief Overview of the Pine Wood Nematode and Pine Wilt Disease in Canada and the United States. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeucchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 13-17.
- Takemoto S. 2008.** Population Ecology of *Bursaphelenchus xylophilus*. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeucchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 105-122.
- Tomiczek C, Hoyer-Tomiczek U. 2008.** Biology Studies Relevant to the Vector Role of *Monochamus* Species for PineWood Nematode. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 215-220.
- Utsuzawa S, Fukuda K, Sakaue D. 2005.** Use of Magnetic Resonance Microscopy for the Nondestructive Observation of Xylem Cavitation Caused by Pine Wilt Disease. *Phytopathology* **95**: 737-743.
- Vicente C, Espada M, Vieira P, Mota M. 2012.** Pine Wilt Disease: a threat to European forestry. *European Journal of Plant Pathology* **133**: 89-99.
- Wang Y, Yamada T, Sakaue D, Suzuki K. 2008.** Influence of Fungi on Multiplication and Distribution of the Pinewood Nematode. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 115-128.
- Webster J, Mota M. 2008.** Pine Wilt Disease: Global Issues, Trade and Economic Impact. In: Mota MM, Vieira P, eds. *Pine Wilt Disease: A Worldwide Threat to Forest Ecosystems*. Dordrecht, Alemanha, Springer, 1-4.
- Zas R, Sampedro L, Moreira X, Martins P. 2008.** Effect of fertilization and genetic variation on susceptibility of *Pinus radiata* seedlings to *Hylobius abietis* damage. *Canadian Journal Forest Research* **38**: 63-72.
- Zas R, Sampedro L, Prada E, Lombardero MJ, Fernández-López J. 2006.** Fertilization increases *Hylobius abietis* L. damage in *Pinus pinaster* Ait. seedlings. *Forest Ecology and Management* **222**: 137-144.
- Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeucchi Y. 2008.** *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 2-4.
- Zhao BG. 2008.** Pine Wilt Disease in China. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeucchi Y, eds. *Pine Wilt Disease*. Tóquio, Japão, Springer, 18-25.

# Anexos

## ANEXO I – Cronogramas

Data	Dezembro 19	Janeiro 13/16	Março 15	Abril 4 12 16 19 23 26					Maio 3 12 19 26				Junho 2 9 16 23 30					Julho 4 7 14 21				26-Jul a 18-Ago				
Dias após inoculação	-168	-82/-79	-20	0	8	12	15	19	22	29	38	45	52	59	66	73	80	87	91	93	100	107	113 a 136			
Aplicação de Regime de rega																										
Inoculação do Nematode																										
Potencial Hídrico de base																										
Potencial Hídrico mínimo																										
Trocas gasosas																										
Fluorescência																										
Índices de Reflectância																										
Sintomatologia																										
Medição da altura e diâmetro da base do troco																										
Medição do comprimento e diâmetro da base de ramos																										
Recolha de material vegetal																										

**Cronograma 1** – Cronograma da Experiência do Stress Hídrico

Data	Dezembro 19	Janeiro 613/1624			Fevereiro 721		Março 71520			Abril 41317202427						Maio 4132027				Junho 3101724				Julho 1471421					22-Jul a 19 Ago	20-Ago a 02-Set
Dias após inoculação	-168	-89	-82/-79	-71	-57	-43	-28	-20	-15	0	9	13	16	20	23	30	39	46	53	60	67	74	81	88	91	93	100	107	108 a 137	138 a 151
Aplicação de Regime de rega																														
Aplicação de MLC																														
Aplicação de Nitrato de Amónio																														
Inoculação do Nematode																														
Potencial Hídrico de base																														
Potencial Hídrico mínimo																														
Trocas gasosas																														
Fluorescência																														
Índices de Reflectância																														
Sintomatologia																														
Medição da altura e diâmetro da base do troco																														
Medição do comprimento e diâmetro da base de ramos																														
Recolha de material vegetal																														

**Cronograma 2** – Cronograma da Experiência da Fertilização do Solo



## ANEXO II – Inoculação de *B. xylophilus*



**Figura 16** – Inoculação de *Bursaphelenchus xylophilus* em pinheiro. 1 – Raspar ligeiramente a casca de maneira a expor o floema, seguido por um corte ao longo da superfície da casca, um pouco acima do local raspado. 2 – Inocular *B. xylophilus* na ferida, estando esta coberta com algodão humedecido. 3 – Cobrir por completo a ferida com algodão humedecido. 4 – Envolver por completo o algodão com Parafilm.